

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 858 523**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

G01N 33/92 (2006.01)

C12N 15/88 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2013** **PCT/US2013/034604**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013** **WO13149141**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2013** **E 13769005 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2020** **EP 2830596**

54 Título: **Nanopartículas neutras derivadas de lípidos**

30 Prioridad:

29.03.2012 US 201261617478 P

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

30.09.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

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

ES 2 858 523 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

Nanopartículas neutras derivadas de lípidos

5 ANTECEDENTES

El uso de vehículos de administración liposomales para facilitar la administración de agentes terapéuticos en un sitio específico representa un campo rápidamente emergente de administración de fármacos; sin embargo, la administración eficaz de agentes terapéuticos a células y tejidos objetivo, así como la posterior transfección de tales células y tejidos objetivo sigue siendo un desafío técnico. A pesar de la disponibilidad de múltiples lípidos y sistemas de administración basados en liposomas para facilitar la administración de agentes terapéuticos a las células y tejidos objetivo, todavía existen muchos desafíos tanto en aplicaciones in vivo como in vitro. Por ejemplo, un inconveniente significativo de los sistemas de administración basados en liposomas se relaciona con la construcción de liposomas que tengan suficiente estabilidad y la capacidad de tales liposomas para liberar eficazmente su contenido encapsulado a células y tejidos objetivo.

Con respecto al desarrollo de vehículos de administración liposomal para su uso en la administración de ácidos nucleicos, la incorporación de lípidos catiónicos como componente de un vehículo liposomal representa un avance importante. Las propiedades de los liposomas catiónicos que incluyen, por ejemplo, su estabilidad, tamaño y carga superficial, los hacen portadores ideales para encapsular y administrar ácidos nucleicos cargados negativamente a células y tejidos objetivo. Los componentes catiónicos (por ejemplo, lípidos catiónicos y/o polímeros catiónicos) que comprenden tales vehículos liposomales catiónicos facilitan la interacción entre la bicapa lipídica del liposoma y los ácidos nucleicos cargados negativamente y mejoran de este modo la eficacia de encapsulación de tales vehículos liposomales catiónicos. En parte debido a su carga superficial positiva, los liposomas preparados que comprenden lípidos catiónicos (por ejemplo, 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP)) han demostrado una capacidad para cargarse eficazmente con ácidos nucleicos cargados negativamente y, el uso de vehículos liposomales catiónicos puede facilitar la encapsulación de ácidos nucleicos a concentraciones que superan con creces las que se logran usando vehículos liposomales neutros. Por ejemplo, en ciertos casos, los sistemas de nanopartículas de lípidos catiónicos pueden caracterizarse por tener eficiencias de encapsulación cercanas al 100% cuando se cargan con ácidos nucleicos cargados negativamente. (Ver, por ejemplo, Li, et al. Pharm Res., 2007, 24: 438-449).

Tang et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 242, no. 1, 6 de enero de 1998, páginas 141-145 describe "un método de síntesis de lípidos catiónicos que contienen disulfuro" y describe la síntesis del "lípido, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-succinil-2-hidroxietil disulfuro ornitina conjugado (DOGSOSO)"

Wetzer et al., Biochemical Journal, vol 356, no. Pt 3, 15 de junio de 2001, páginas 747-756 describe "ADn plásmido ... complejoado con lípidos catiónicos que llevan un enlace disulfuro".

Muchos lípidos catiónicos empleados para construir tales vehículos liposomales son, sin embargo, generalmente tóxicos y por consiguiente pueden ser de utilidad limitada, particularmente en las cantidades necesarias para administrar cantidades terapéuticamente eficaces de sus contenidos encapsulados (por ejemplo, ácidos nucleicos). Limitando adicionalmente la utilidad de los sistemas liposomales cargados, después de su administración a un sujeto, tales sistemas cargados pueden depurarse rápidamente de la circulación sistémica y limitar de este modo su distribución y acumulación en células y tejidos objetivo. Para superar los desafíos técnicos asociados con el uso de vehículos liposomales catiónicos, se ha empleado el uso de sistemas de administración de liposomas multicomponente. En particular, la preparación de vehículos liposomales usando lípidos ionizables se ha empleado como un medio para modular la carga de un liposoma en respuesta al pH cambiante de un entorno (por ejemplo, pH fisiológico) al que se expone el liposoma. Por lo tanto, tales lípidos ionizables se adaptan a cambios en su carga superficial, que puede manipularse, por ejemplo, para mejorar la eficacia de encapsulación del liposoma.

A pesar de las limitaciones anteriores, y como resultado de su capacidad para facilitar la administración de materiales encapsulados a las células objetivo, los vehículos basados en liposomas son un portador atractivo para agentes terapéuticos y siguen siendo objeto de continuos esfuerzos de desarrollo. Aunque los vehículos basados en liposomas que comprenden un componente lipídico catiónico han mostrado resultados prometedores con respecto a la encapsulación y la estabilidad, sigue habiendo una gran necesidad de sistemas de administración basados en liposomas mejorados.

Al contrario que con los vehículos basados en liposomas cargados, los vehículos liposomales neutros se caracterizan generalmente por tener propiedades farmacocinéticas relativamente mejoradas. Sin embargo, en parte debido a la baja eficiencia de encapsulación observada con liposomas neutros, se han realizado estudios limitados para investigar el uso de liposomas neutros para administrar agentes terapéuticos a células objetivo. Sigue habiendo una necesidad de nuevos lípidos que incorporen un enfoque multifuncional para administrar polinucleótidos y ácidos nucleicos encapsulados. Particularmente necesarias son las nanopartículas lipídicas que conservan algunas de las características beneficiosas de los sistemas de administración de liposomas tanto neutros como cargados.

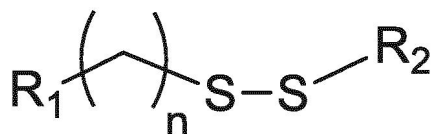
SUMARIO

En la presente se describen nuevos lípidos y nanopartículas lipídicas que comprenden tales lípidos. También se divulgan métodos para usar tales lípidos (por ejemplo, lípidos catiónicos escindibles) como un componente de una nanopartícula lipídica para facilitar la encapsulación de uno o más agentes terapéuticos (por ejemplo, polinucleótidos terapéuticos) en tales nanopartículas lipídicas. También se divulgan en la presente métodos para preparar nanopartículas lipídicas neutras que se caracterizan por tener altas eficiencias de encapsulación (por ejemplo, con respecto a las nanopartículas lipídicas neutras tradicionales). Los nuevos métodos, lípidos y composiciones descritos en la presente emplean una estrategia multifuncional para facilitar la encapsulación de uno o más agentes terapéuticos en una nanopartícula lipídica neutra y la posterior transfección de una o más células objetivo con tal nanopartícula lipídica.

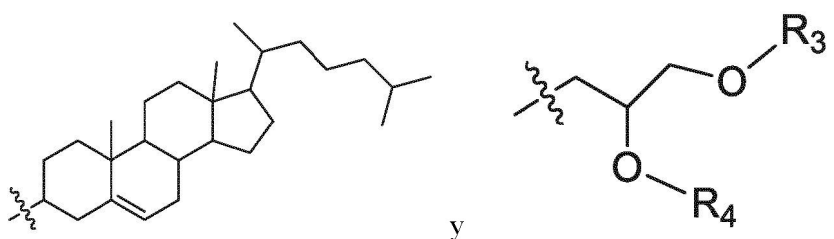
En la presente se divulgan nuevos lípidos y métodos relacionados para usar tales lípidos para modular las propiedades (por ejemplo, carga superficial) de, por ejemplo, vehículos liposomales (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) en los que se incorporan tales nuevos lípidos. La presente invención se refiere a métodos para manipular una nanopartícula lipídica que comprende por lo menos un lípido que tiene un grupo de cabeza polar liberable, dicho método comprendiendo un paso de poner en contacto el vehículo liposomal con uno o más agentes para provocar la liberación del grupo de cabeza polar de por lo menos un lípido. Tras la liberación del grupo de cabeza polar del lípido, el vehículo liposomal tiene una carga superficial neutra global (por ejemplo, una carga superficial neta o un potencial zeta de aproximadamente -2,5 a aproximadamente + 2,5 mV).

En particular, la presente invención proporciona un método para encapsular uno o más agentes terapéuticos en una nanopartícula lipídica, dicho método comprendiendo los pasos de: (a) cargar una nanopartícula lipídica que comprende por lo menos un lípido catiónico reducible con el uno o más agentes terapéuticos; y (b) poner en contacto la nanopartícula lipídica con uno o más agentes reductores de tal manera que se neutralice la nanopartícula lipídica;

en donde dicho lípido catiónico reducible tiene la estructura:



en donde R_1 es un grupo de cabeza polar liberable y se selecciona del grupo que consiste de imidazol, guanidinio, imina, enamina, amino, y alquil amino opcionalmente sustituido y un piridilo opcionalmente sustituido; en donde R_2 se selecciona del grupo que consiste de



en donde R_3 y R_4 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de un alquilo C_6 - C_{20} opcionalmente sustituido, variablemente saturado o insaturado y un acilo C_6 - C_{20} opcionalmente sustituido, variablemente saturado o insaturado;

en donde n es cero o cualquier número entero positivo.

En otra realización, la presente invención proporciona una nanopartícula lipídica neutra que tiene uno o más agentes terapéuticos encapsulados preparados de acuerdo con el método de la presente invención.

En otra realización, la presente invención proporciona una nanopartícula lipídica neutra que tiene uno o más agentes terapéuticos encapsulados preparados de acuerdo con el método de la presente invención para su uso en terapia.

Los métodos divulgados en la presente comprenden un paso de poner en contacto el lípido o la nanopartícula lipídica con uno o más agentes reductores de tal manera que el grupo de cabeza polar (R_1) pueda escindirse o liberarse de otro modo de uno o más de los lípidos escindibles que comprenden la nanopartícula lipídica

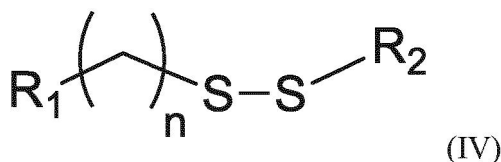
(por ejemplo, mediante la reducción del grupo conector escindible), provocando de este modo que el grupo R₂ lipófilo permanezca como un componente de la nanopartícula lipídica. La escisión y/o liberación del grupo R₁ polar del lípido hace que se modifique la carga global del lípido restante (y la nanopartícula lipídica de la que el lípido es un componente) y hace que se neutralice la nanopartícula lipídica.

Los agentes reductores contemplados incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas que comprenden uno o más de tris (2-carboxietil)fosfina (TCEP), β-mercaptoetanol (β-ME), ditioneitol (DTT), glutatión y ditioneitol. Puede seleccionarse un agente reductor apropiado en base a la naturaleza del grupo conector de disulfuro escindible que comprende el lípido. Por ejemplo, un lípido que comprende un grupo conector de disulfuro que es susceptible de digestión enzimática puede ponerse en contacto o exponerse de otro modo a una enzima apropiada para facilitar la escisión del grupo de cabeza polar del lípido. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, tales enzimas pueden incluir una o más de las enzimas seleccionadas del grupo que consiste de tioredoxina y tiol reductasa lisosomal inducible por gamma-interferón (GILT).

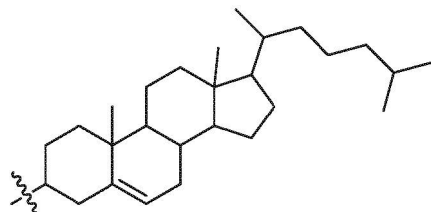
En algunas realizaciones, el grado en que se modifican las propiedades (por ejemplo, la carga superficial o el potencial zeta medio) de la nanopartícula lipídica es una función de los agentes reductores seleccionados a los que se expone la nanopartícula lipídica y/o la duración de tal exposición. En ciertas realizaciones, la nanopartícula lipídica se pone en contacto con el agente reductor entre aproximadamente cinco minutos y aproximadamente veinticuatro horas (por ejemplo, por lo menos aproximadamente un minuto, dos minutos, tres minutos, cuatro minutos, cinco minutos, seis minutos, siete minutos, ocho minutos, nueve minutos, diez minutos, doce minutos, quince minutos, treinta minutos, cuarenta y cinco minutos, una hora, tres horas, seis horas, ocho horas, doce horas, dieciséis horas, dieciocho horas, veinticuatro horas, o más). Por ejemplo, una nanopartícula lipídica preparada de acuerdo con la presente invención puede tener un potencial zeta medio (Z_{ave}) de por lo menos aproximadamente +25 mV antes de poner en contacto la nanopartícula lipídica con uno o más agentes reductores. En ciertas realizaciones, la carga positiva de la nanopartícula lipídica puede facilitar la encapsulación o carga de uno o más agentes terapéuticos, y en particular agentes terapéuticos cargados negativamente (por ejemplo, ácidos nucleicos terapéuticos que codifican una proteína o enzima funcional). Por ejemplo, las nanopartículas lipídicas preparadas de acuerdo con los métodos divulgados en la presente pueden demostrar altas eficiencias de encapsulación (por ejemplo, por lo menos el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 87,5%, 90%, 92,5%, 95%, 97,5%, 98%, 99%, 99,5% o más). De manera similar, las nanopartículas lipídicas preparadas de acuerdo con los métodos divulgados en la presente pueden caracterizarse con respecto a la concentración media de uno o más agentes terapéuticos encapsulados en tales composiciones. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la concentración media del agente terapéutico encapsulado en una nanopartícula lipídica preparada de acuerdo con la presente invención está entre aproximadamente 0,025 µg/ml y aproximadamente 250 µg/ml (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml, 15µg/ml, 20µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml, 75µg/ml, 100µg/ml, 150µg/ml, 200µg/ml o más).

Una vez cargadas con uno o más agentes terapéuticos, las propiedades físicas de las nanopartículas lipídicas pueden modificarse. Por ejemplo, la carga superficial de una nanopartícula lipídica cargada positivamente (por ejemplo, nanopartículas lipídicas que tienen una Z_{ave} de más de aproximadamente +20 mV) puede reducirse o neutralizarse (por ejemplo, reduciendo la Z_{ave} a menos de aproximadamente +10 mV) basándose en uno o más objetivos, como las características de las células o tejidos objetivo. Las propiedades físicas de la nanopartícula lipídica se modulan poniendo en contacto la nanopartícula lipídica con una solución acuosa que comprende uno o más agentes reductores. Poner en contacto la nanopartícula lipídica con tales agentes reductores hace que uno o más de los grupos conectores de disulfuro escindibles del lípido se escindan, dando como resultado la disociación del grupo de cabeza polar (R₁) del grupo lipófilo (R₂) del lípido y una reducción correspondiente de la Z_{ave} de la nanopartícula lipídica restante. En ciertas realizaciones, después de la exposición a un agente reductor, la Z_{ave} de la nanopartícula lipídica está entre aproximadamente +10 mV y aproximadamente -20 mV (por ejemplo, +10 mV, +7,5 mV, +5 mV, +4 mV, +3 mV, +2,5 mV, +2 mV, +1 mV, +0,5 mV, 0 mV, -0,5 mV, -1 mV, -2 mV, -2,5 mV, -3 mV, -4 mV, -5 mV, -7,5 mV, -10 mV, -12,5 mV, -15 mV o -20 mV). En ciertas realizaciones, después de la exposición a un agente reductor, la Z_{ave} de la nanopartícula lipídica está entre aproximadamente -50 mV y aproximadamente -5 mV.

La capacidad para modular una o más de las propiedades físicas de una nanopartícula lipídica (por ejemplo, la capacidad para reducir la Z_{ave}) se relaciona con la composición de los lípidos constituyentes que comprenden dicha composición, y en particular se relaciona con la presencia de uno o más grupos conectores de disulfuro escindibles que comprenden los lípidos constituyentes que comprenden tal nanopartícula lipídica. En ciertas realizaciones, uno o más de los lípidos constituyentes que comprenden la nanopartícula lipídica comprende un grupo conector disulfuro (S-S) escindible, como se representa, por ejemplo, por la estructura siguiente:

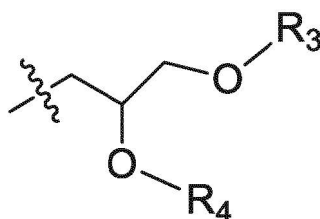


en donde R_1 es un grupo de cabeza liberable (polar) seleccionado del grupo que consiste de imidazol, guanidinio, imina, enamina, amino, un alquil amino opcionalmente sustituido (por ejemplo, un alquil amino como dimetilamino) y una piridina o piridilo opcionalmente sustituidos (por ejemplo, piridina o nitropiridilo); en donde R_2 es un grupo de cola seleccionado del grupo que consiste de:



(II),

y



(III),

en donde R_3 y R_4 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de un alquilo C_6 - C_{20} opcionalmente sustituido, variablemente saturado o insaturado y un acilo C_6 - C_{20} opcionalmente sustituido, variablemente saturado o insaturado; y en donde n es cero o cualquier número entero positivo.

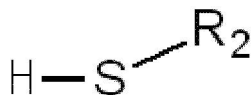
Tras poner en contacto el lípido (o una nanopartícula lipídica que comprende dicho lípido) con uno o más agentes (por ejemplo, una solución acuosa que comprende por lo menos un agente reductor capaz de escindir reductivamente el grupo conector disulfuro), el grupo conector disulfuro se escinde del lípido y se libera un grupo polar representado por la siguiente estructura:



(V),

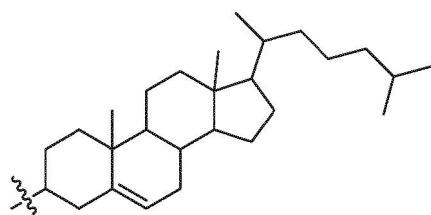
en donde R_1 es el grupo de cabeza liberable seleccionado del grupo que consiste de imidazol, guanidinio, imina, enamina, amino, un alquil amino opcionalmente sustituido (por ejemplo, un alquil amino como dimetilamino) y un piridilo opcionalmente sustituido; y de este modo se neutraliza el lípido (y la nanopartícula lipídica de la cual el lípido es un componente).

En ciertas realizaciones, tras la exposición del lípido, y en particular del grupo conector disulfuro escindible que comprende el lípido, a uno o más agentes reductores (por ejemplo, β -mercaptoetanol (β -ME)) un grupo tiol, como se representa por la siguiente estructura, permanece como componente de la nanopartícula lipídica:



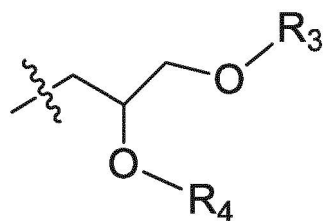
(VI),

en donde R_2 se selecciona del grupo que consiste de:



(II),

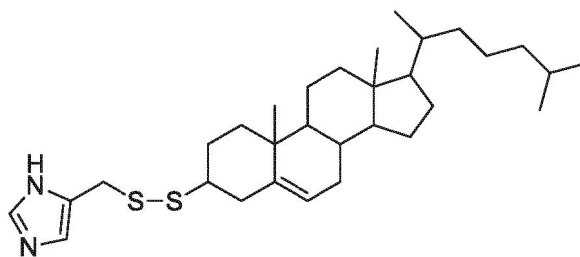
y



(III)

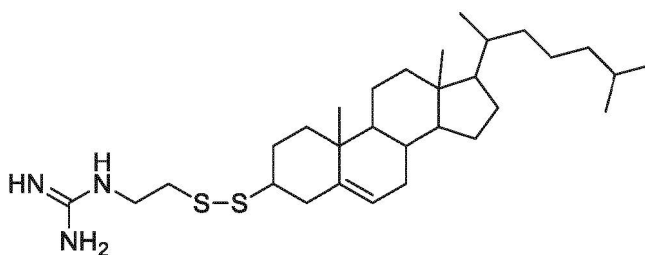
en donde R_3 y R_4 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de un alquilo C_6 - C_{20} opcionalmente sustituido, variablemente saturado o insaturado y un acilo C_6 - C_{20} opcionalmente sustituido, variablemente saturado o insaturado.

En ciertas realizaciones, los lípidos escindibles se relacionan con uno o más de los compuestos lipídicos y métodos relacionados divulgado en la Solicitud de Estados Unidos de titularidad compartida N° 61/494,45 (WO 2012/170889 A1). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el lípido escindible es 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, que tiene la estructura de fórmula XI (a la que se hace referencia en la presente como "HGT4001").



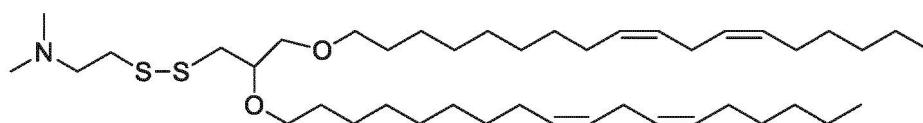
(XI)

En algunas realizaciones, el lípido escindible es el compuesto 1-(2-(((3S,10R,13R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptán-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, que tiene la estructura de fórmula XII (a la que se hace referencia en la presente como "HGT4002").



(XII)

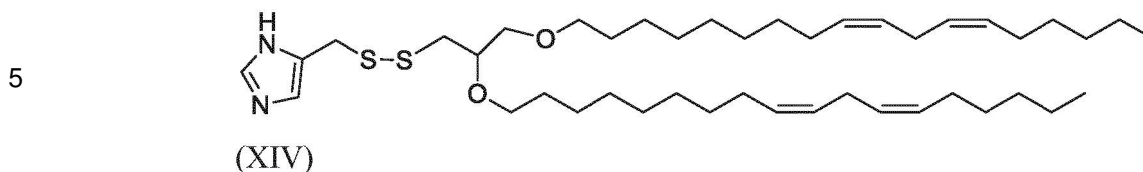
En algunas realizaciones, el lípido escindible es el compuesto 2-((2,3-Bis((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi)propil)disulfanil)-N,N-dimetiletanamina, que tiene la estructura de fórmula XIII (a la que se hace referencia en la presente como "HGT4003").



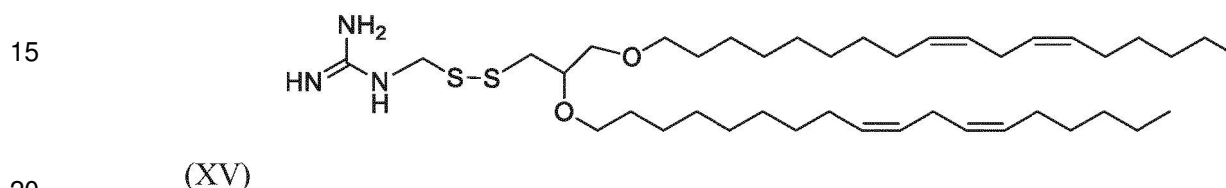
(XIII)

En otras realizaciones más, el lípido escindible es 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 XIV (a la que se hace referencia en la

presente como "HGT4004").



10 En otras realizaciones más, el lípido escindible es el compuesto 1-(((2,3-bis((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-ilo)propil)disulfanil)metil)guanidina que tiene la estructura de Fórmula XV (a la que se hace referencia en la presente como "HGT4005").



20 Los lípidos y nanopartículas lipídicas descritos en la presente pueden usarse para administrar uno o más agentes terapéuticos a células, órganos y tejidos objetivo (por ejemplo, hepatocitos). En ciertas realizaciones, los agentes terapéuticos contemplados comprenden uno o más ácidos nucleicos o polinucleótidos terapéuticos (por ejemplo, ADN o ARN). Por consiguiente, en la presente se divulgan métodos y composiciones para modular la expresión de uno o más ácidos nucleicos en un sujeto. En ciertas realizaciones, tales ácidos nucleicos terapéuticos comprenden o consisten de ARN (por ejemplo, ARNm, ARNip, ARNsno o microARN).

25 En la presente también se divulgan métodos para encapsular uno o más agentes terapéuticos en una nanopartícula lipídica neutra. Tales métodos generalmente comprenden un paso de cargar la nanopartícula lipídica (por ejemplo, una nanopartícula lipídica que comprende el lípido escindible HGT4002, DMG-PEG2000, colesterol y DOPE) con uno o más agentes terapéuticos y poner en contacto la nanopartícula lipídica con uno o más agentes reductores de tal manera que se neutralice la nanopartícula lipídica. En una realización preferida, la nanopartícula lipídica (por ejemplo, una nanopartícula lipídica que comprende uno o más lípidos escindibles, un lípido modificado con PEG y un lípido auxiliar) preparada de acuerdo con tales métodos se carga con uno o más agentes terapéuticos antes de entrar en contacto con un agente reductor.

30 En ciertas realizaciones, los compuestos lipídicos divulgados en la presente son lípidos catiónicos y/o ionizables, que pueden usarse como una nanopartícula lipídica o alternativamente como componente de una nanopartícula lipídica. En ciertas realizaciones, los compuestos divulgados en la presente se usan para enriquecer una nanopartícula lipídica, confiriéndole de este modo propiedades mejoradas a dicha nanopartícula lipídica enriquecida (por ejemplo, administración mejorada de polinucleótidos encapsulados a una o más células objetivo y/o toxicidad in vivo reducida de una nanopartícula lipídica). Por consiguiente, también se contemplan nanopartículas lipídicas que comprenden uno o más de los lípidos divulgados en la presente. En ciertas realizaciones, tales nanopartículas lipídicas comprenden uno o más de un lípido PEG-modificado, un lípido no catiónico y un lípido auxiliar.

35 En ciertas realizaciones, una o más de las nanopartículas lipídicas descritas en la presente comprenden uno o más lípidos adicionales. Por ejemplo, las nanopartículas lipídicas que comprenden o que están enriquecidas de otro modo con uno o más de los compuestos lipídicos escindibles divulgados en la presente pueden comprender además uno o más de DOTAP (1,2-dioleil-3-trimetilamonio propano), DODAP (1,2-dioleil-3-dimetilamonio propano), DOTMA (1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano), DlinDMA, Dlin-KC2-DMA, C12-200 e ICE. En una realización, la nanopartícula lipídica comprende HGT4001, DOPE y DMG-PEG2000. En otra realización, la nanopartícula lipídica comprende HGT4003, DOPE, colesterol y DMG-PEG2000.

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

45 De manera similar, las nanopartículas lipídicas divulgadas en la presente pueden comprender o estar enriquecidas de otro modo con uno o más de los compuestos lipídicos divulgados en la presente y pueden comprender además uno o más lípidos auxiliares que se seleccionan del grupo que consiste de DSPC (1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfolina), DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina), DOPE (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DPPE (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DMPE (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-

fosfoetanolamina), DOPG (1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfo-(1'-*rac*-glicerol)), DOPE (1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina), DSPE (1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina), DLPE (1,2-dilauroil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina), DPPS (1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina), ceramidas, esfingomielinas y colesterol.

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

En ciertas realizaciones, los polinucleótidos encapsulados en nanopartículas lipídicas de la presente comprenden ARNm que codifica, por ejemplo, un polipéptido funcional, proteína o enzima, y tras ser expresados (es decir, traducidos) por una o más células objetivo, se produce un producto de polipéptido funcional (por ejemplo, una proteína o enzima) y, en algunos casos, la célula objetivo lo secreta 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 otro modo) las nanopartículas lipídicas descritas en la presente codifican un ácido nucleico (por ejemplo, un polipéptido) que el sujeto expresa de manera aberrante. En ciertas realizaciones, el uno o más de los polinucleótidos encapsulados que comprenden tales nanopartículas lipídicas codifican una proteína funcional o enzima 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, el uno o más de los polinucleótidos encapsulados comprenden ARNm que codifica una enzima asociada con un trastorno de almacenamiento lisosomal (por ejemplo, el polinucleótido encapsulado es ARNm que codifica una o más de las enzimas alfa galactosidasa A, iduronato-2-sulfatasa, iduronato sulfatasa, N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa, beta-glucosidasa y galactocerebrosidasa). En otras realizaciones en las que los ácidos nucleicos comprenden ARNm, dicho 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 de eritropoyetina, hormona del crecimiento humano, regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), alfa-L-iduronidasa, N-acetilglucosaminidasa, alfa-glucosaminidasa acetiltransferasa, N-acetilglucosamina 6-sulfatasa, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, galactosa-6-sulfato sulfatasa, beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa, glucocerebrosidasa, heparán sulfamidasa, heparina-N-sulfatasa, lipasa de ácido lisosomal, alfa-glucosidasa ácida, arilsulfatasa A e hialuronidasa).

También se contemplan en la presente nanopartículas lipídicas que comprenden uno o más de los compuestos lipídicos divulgados en la presente 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 pueden comprender, por ejemplo, una modificación de bloqueo final de una región no traducida 5' o 3' del ARNm. En ciertas realizaciones, la modificación química comprende la inclusión de una secuencia parcial de un gen inmediato temprano 1 (IE1) de CMV en la región 5' no traducida del ARNm. En otras realizaciones, la modificación química comprende la inclusión de una cola de poli A en la región 3' no traducida del ARNm. También se contemplan modificaciones químicas que comprenden la inclusión de una estructura Cap1 en la región no traducida 5' del ARNm. En otras realizaciones más, la modificación química comprende la inclusión de una secuencia que codifica la hormona del crecimiento humana (hGH) para la región 3' no traducida del ARNm.

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

También se divulga una nanopartícula lipídica neutra que tiene uno o más agentes terapéuticos encapsulados para su uso en métodos para tratar enfermedades (por ejemplo, una enfermedad asociada con la expresión aberrante de un gen o ácido nucleico) en un sujeto. También se contempla una nanopartícula lipídica neutra que tiene uno o más agentes terapéuticos encapsulados para su uso en métodos para transfectar una o más células objetivo con uno o más polinucleótidos, en donde el método comprende poner en contacto la una o más células objetivo con los lípidos o nanopartículas lipídicas descritas en la presente de tal manera que una o más células objetivo se transfecten con el uno o más polinucleótidos encapsulados en la misma.

Las características analizadas anteriormente y muchas otras características y ventajas concomitantes de la

presente invención se entenderán mejor por referencia a la siguiente descripción detallada de la invención cuando se toma junto con los ejemplos acompañantes. Las varias realizaciones descritas en la presente son complementarias y pueden combinarse o usarse juntas de una manera que entienda por el experto en la técnica a la vista de las enseñanzas contenidas en la presente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. ilustra una realización de la presente invención mediante la cual una nanopartícula lipídica que comprende un lípido catiónico de disulfuro (S-S) escindible y que está cargada con uno o más agentes terapéuticos se pone en contacto con un agente reductor. Como se representa en la **FIG. 1**, antes de poner en contacto la nanopartícula lipídica con un agente reductor, la superficie de la nanopartícula lipídica está cargada positivamente por los grupos de cabeza catiónicos ionizables del lípido escindible. El contacto de la nanopartícula lipídica con el agente reductor provoca la escisión del enlace disulfuro (S-S) del lípido catiónico y la disociación del grupo de cabeza amino catiónico del lípido escindible de la nanopartícula lipídica. En la realización representada, la superficie de la nanopartícula lipídica resultante se neutraliza.

Figura 2. divulga una nanopartícula lipídica que comprende un lípido catiónico de disulfuro (S-S) escindible y que está cargada con uno o más agentes terapéuticos se neutraliza poniéndola en contacto con un agente reductor. El lípido neutralizado se modifica adicionalmente para introducir grupos funcionales o químicas diferentes. Como se representa en la **FIG. 2**, antes de poner en contacto la nanopartícula lipídica con un agente reductor, la superficie de la nanopartícula lipídica está cargada positivamente por los grupos de cabeza catiónicos ionizables del lípido escindible. El contacto de la nanopartícula lipídica con el agente reductor hace que el enlace disulfuro (S-S) del lípido catiónico se escinda y los grupos de cabeza amino catiónicos del lípido escindible se disocian de la nanopartícula lipídica. La superficie de la nanopartícula lipídica resultante se neutraliza y, como se ilustra, se recubre con grupos funcionales sulfhidrilo (-SH), que pueden reaccionar adicionalmente para introducir grupos funcionales o químicas adicionales. Como se ilustra en la **FIG. 2**, la nanopartícula lipídica neutralizada se pone en contacto con un grupo R funcional que es capaz de reaccionar con los grupos funcionales sulfhidrilo (-SH) que recubren la superficie de la nanopartícula lipídica y une de este modo el grupo R funcional a la superficie de la nanopartícula lipídica mediante un enlace disulfuro recién formado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En la presente se proporcionan nuevos lípidos y nanopartículas lipídicas preparadas usando tales nuevos lípidos. Las composiciones divulgadas en la presente abordan muchas de las limitaciones asociadas con los sistemas tradicionales de administración de liposomas neutros con carga superficial, por ejemplo, las eficiencias de encapsulación deficientes que se asocian frecuentemente con los lípidos de carga neutra. La invención descrita en la presente se refiere de manera general a métodos para usar nuevos lípidos catiónicos escindibles para facilitar la encapsulación eficaz de uno o más agentes terapéuticos (por ejemplo, polinucleótidos) en una nanopartícula lipídica.

Las propiedades farmacocinéticas y la capacidad de una nanopartícula lipídica administrada sistémicamente para alcanzar una célula, órgano o tejido objetivo están frecuentemente influenciadas por la carga superficial de dicha nanopartícula lipídica. Por ejemplo, después de la administración sistémica a un sujeto, es más probable que las nanopartículas lipídicas que tienen una alta carga superficial interactúen con ciertas células, órganos o macromoléculas en la circulación periférica y aceleren de este modo la excreción de tales nanopartículas lipídicas antes de que alcancen las células o tejidos objetivo. Como resultado, la eficacia y utilidad de algunas composiciones basadas en liposomas y los agentes terapéuticos encapsulados en las mismas pueden estar significativamente limitadas.

Las nanopartículas lipídicas que se caracterizan por ser de carga relativamente neutra han demostrado frecuentemente características farmacocinéticas mejoradas con respecto a sus contrapartidas cargadas; sin embargo, tales nanopartículas lipídicas de carga neutra han estado tradicionalmente plagadas de eficiencias de encapsulación pobres, particularmente con respecto a la encapsulación de ácidos nucleicos o polinucleótidos. Por ejemplo, los lípidos neutros y las nanopartículas lipídicas de carga superficial neutra preparadas a partir de dichos lípidos demuestran eficiencias de encapsulación extremadamente bajas, que frecuentemente son menores del 10% con respecto a las terapias basadas en ácidos nucleicos. Sigue habiendo una necesidad reconocida en la técnica de nanopartículas lipídicas que lleven una carga superficial relativamente neutra y que demuestren altas eficiencias de encapsulación.

En la presente se divulgan nuevos lípidos, nanopartículas lipídicas y métodos de uso relacionados que demuestran eficiencias de encapsulación mejoradas, cuyas cargas superficiales pueden neutralizarse o modificarse de otro modo. Por lo tanto, los lípidos y los métodos relacionados descritos en la presente conservan propiedades beneficiosas que están generalmente asociadas con lípidos cargados (por ejemplo, altas eficiencias de encapsulación) y, en ciertas realizaciones, pueden diseñarse para que lleven una carga superficial relativamente neutra.

En general, los lípidos divulgados en la presente comprenden un grupo de cabeza hidrófilo (polar) que está unido a un grupo lipófilo (no polar) por medio de un grupo conector disulfuro intermedio. Tales lípidos pueden usarse para preparar nanopartículas lipídicas adecuadas para encapsular uno o más agentes terapéuticos (por ejemplo, polinucleótidos que codifican una proteína o enzima funcional). El grupo conector disulfuro que comprende los lípidos puede escindirse, por ejemplo, mediante la exposición del lípido a un agente reductor, y el grupo de cabeza hidrófilo liberado para neutralizar de este modo la carga superficial del lípido o nanopartícula lipídica. Los lípidos se formulan como un componente de una nanopartícula lipídica y la carga superficial de dicha composición se neutraliza después de que se haya encapsulado un agente terapéutico en dicha composición. Encapsular los agentes terapéuticos dentro de la nanopartícula lipídica mientras la superficie de tal composición está cargada mejora la eficiencia de encapsulación.

Los métodos divulgados en la presente comprenden un paso de poner en contacto el lípido (o la nanopartícula lipídica de la cual es un componente el lípido) con uno o más agentes reductores de tal manera que el grupo de cabeza polar (R_1) del lípido pueda ser escindido o liberado de otro modo de uno o más de los lípidos escindibles que comprenden la nanopartícula lipídica (por reducción del grupo conector disulfuro escindible), haciendo de este modo que el grupo R_2 lipófilo permanezca como un componente de la nanopartícula lipídica. La escisión y/o liberación del grupo de la cabeza polar (R_1) del lípido hace que la carga total del lípido restante (y la nanopartícula lipídica de la que el lípido es un componente) se modifique y hace que se neutralice la nanopartícula lipídica.

Como se usa en la presente, los términos "neutro" y "neutralizar" se refieren a un lípido, y en particular a una nanopartícula lipídica que es sustancialmente neutra en la carga superficial o que se vuelve sustancialmente neutra en la carga superficial de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente. Los lípidos catiónicos divulgados en la presente pueden usarse para preparar una nanopartícula lipídica que tiene una carga superficial positiva (por ejemplo, Z_{ave} de aproximadamente +30 mV) y que encapsula uno o más polinucleótidos. Tal nanopartícula lipídica puede modificarse de acuerdo con las enseñanzas proporcionadas en la presente de tal manera que la composición se neutralice relativamente (por ejemplo, Z_{ave} entre aproximadamente -3,0 mV y +3,0 mV). En ciertas realizaciones, las nanopartículas lipídicas neutras descritas en la presente pueden caracterizarse por tener una Z_{ave} entre aproximadamente -10,0 mV y +10,0 mV (por ejemplo, aproximadamente +10 mV, +8 mV, +7,5 mV, +6 mV, +5 mV, +4 mV, +3 mV, +2,5 mV, +2 mV, +1 mV, +0,5 mV, +0,25 mV, 0 mV, -0,25 mV, -0,5 mV, -1 mV, -2 mV, -2,5 mV, -3 mV, -4 mV, -5 mV, -7,5 mV o -10 mV), o preferiblemente entre aproximadamente -2,5 mV y +2,5 mV. Alternativamente, en ciertas realizaciones, las nanopartículas lipídicas modificadas descritas en la presente pueden caracterizarse por tener una Z_{ave} entre aproximadamente -5 mV y aproximadamente -50 mV.

El potencial zeta (Z_{ave}) medio es indicativo de la carga superficial media de una población de nanopartículas lipídicas y representa una medida de la carga eléctrica media de dicha nanopartícula lipídica. La Z_{ave} afecta al tamaño de las partículas, la estabilidad de las partículas, la eficacia de encapsulación y las propiedades farmacocinéticas de una nanopartícula lipídica. En ciertas realizaciones en las que el agente terapéutico a encapsular comprende un polinucleótido aniónico (por ejemplo, ARNm que codifica una enzima funcional), puede ser más eficaz encapsular dicho polinucleótido en una nanopartícula lipídica que incorpore uno o más lípidos catiónicos de la presente divulgación. En tal realización, la interacción y encapsulación del polinucleótido aniónico dentro de la bicapa lipídica catiónica de la nanopartícula lipídica sirve para mejorar la eficacia de encapsulación de la nanopartícula lipídica. En ciertas realizaciones, una vez que se ha encapsulado el agente terapéutico, la carga superficial de la nanopartícula lipídica puede neutralizarse de acuerdo con la enseñanzas de la presente.

Como se usa en la presente, el término "alquilo" se refiere a hidrocarburos C_1 - C_{40} de cadena lineal como ramificada (por ejemplo, hidrocarburos C_6 - C_{20}), e incluyen hidrocarburos tanto saturados como insaturados. En ciertas realizaciones, el alquilo puede comprender uno o más alquilo cíclicos y/o uno o más heteroátomos como oxígeno, nitrógeno o azufre y puede estar opcionalmente sustituido con sustituyentes (por ejemplo, uno o más de alquilo, halo, alcoxi, hidroxilo, amino, arilo, éter, éster o amida). En ciertas realizaciones, un alquilo contemplado incluye (9Z, 12Z)-octadeca-9,12-dien. Se pretende que el uso de designaciones como, por ejemplo, " C_6 - C_{20} " se refiera a un alquilo (por ejemplo, de cadena lineal o ramificada e inclusive de alquenos y alquilo) que tiene el intervalo enumerado de átomos de carbono. Como se usa en la presente, el término "arilo" se refiere a grupos aromáticos (por ejemplo, estructuras monocíclicas, bicíclicas y tricíclicas) que contienen de seis a diez carbonos en la parte del anillo. Los grupos arilo pueden estar opcionalmente sustituidos a través de átomos de carbono disponibles y en ciertas realizaciones pueden incluir uno o más heteroátomos como oxígeno, nitrógeno o azufre.

Como se usa en la presente, la frase "grupo conector" se refiere a una fracción funcional orgánica que está unida covalentemente al grupo de cabeza hidrófilo (polar) y al grupo de cola lipófilo (no polar). De acuerdo con la presente invención, el grupo conector puede escindirse por reducción o enzimáticamente tras entrar en contacto con uno o más agentes reductores, provocando de este modo la disociación del grupo de cabeza del grupo de cola restante. Cabe señalar que los términos "grupo de cabeza" y "grupo de cola" como se usan en la presente para describir los lípidos de la presente divulgación, y en particular los grupos funcionales que comprenden tales lípidos, se usan para facilitar la referencia para describir la orientación de uno o más grupos funcionales con respecto a otros grupos funcionales. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, un grupo de cabeza hidrófilo (por ejemplo,

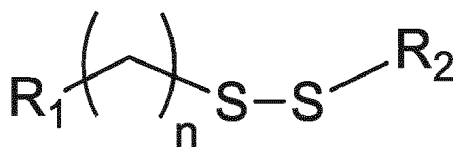
guanidinio) se une (por ejemplo mediante uno o más de los enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones iónicas y enlaces covalentes) a un grupo conector disulfuro escindible, que a su vez se une a un grupo de cola hidrófobo (por ejemplo, colesterol).

En ciertas realizaciones, por lo menos uno de los grupos funcionales o fracciones que comprenden los lípidos divulgados en la presente es de naturaleza hidrófoba (por ejemplo, un grupo de cola hidrófobo que comprende un lípido de origen natural como el colesterol). Como se usa en la presente, el término "hidrófobo" se usa para indicar en términos cualitativos que un grupo funcional evita el agua, y típicamente tales grupos no son solubles en agua. Por ejemplo, en la presente se divulgan compuestos que comprenden un grupo disulfuro (S-S) escindible unido a uno o más grupos hidrófobos, en donde dichos grupos hidrófobos comprenden uno o más lípidos de origen natural como colesterol, y/o un grupo alquilo C₆-C₂₀ opcionalmente sustituido, variablemente saturado o insaturado y/o un acilo C₆-C₂₀ opcionalmente sustituido, variablemente saturado o insaturado.

En ciertas realizaciones, por lo menos uno de los grupos funcionales o fracciones que comprenden los lípidos divulgados en la presente es de naturaleza hidrófila (por ejemplo, un grupo de cabeza hidrófilo que comprende una fracción de imidazol catiónica). Como se usa en la presente, el término "hidrófilo" se usa para indicar en términos cualitativos que un grupo funcional prefiere el agua y, típicamente, tales grupos son solubles en agua. Por ejemplo, en la presente se divulgan compuestos que comprenden un grupo funcional disulfuro (S-S) escindible unido a uno o más grupos hidrófilos (por ejemplo, un grupo de cabeza hidrófilo), en donde dichos grupos hidrófilos comprenden o se seleccionan del grupo que consiste de imidazol, guanidinio, amino, imina, enamina, un alquil amino opcionalmente sustituido (por ejemplo, un alquil amino como dimetilamino) y piridilo. El grupo de cabeza hidrófilo del lípido está cargado (por ejemplo, un grupo de cabeza de imidazol catiónico). Tras la escisión de dicho grupo conector cargado del lípido de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, el grupo de cabeza hidrófilo unido al mismo se libera del lípido y de este modo se neutraliza el lípido restante (o la nanopartícula lipídica de la que tal lípido restante es un componente).

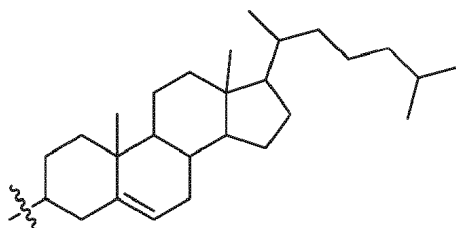
La presente invención se refiere a un método para neutralizar una nanopartícula lipídica de tal manera que se modifique la carga superficial de dicha composición. Generalmente, tales nanopartículas lipídicas comprenden por lo menos un lípido que tiene un grupo de cabeza (por ejemplo, un grupo de cabeza catiónico) que está unido (por ejemplo, unido covalentemente) a un grupo conector disulfuro. En realizaciones, el grupo conector es (o comprende) un grupo disulfuro que es susceptible de escisión (por ejemplo, escisión química o enzimática). Dicha escisión puede catalizarse tras la exposición a uno o más agentes reductores. La disociación del grupo de cabeza polar del lípido (por ejemplo, como puede observarse tras la escisión del grupo conector disulfuro) da como resultado una modificación de la carga de dicho lípido (o la nanopartícula lipídica de la que dicho lípido es un componente).

Los compuestos lipídicos divulgados en la presente comprenden generalmente uno o más grupos conectores disulfuro escindibles. Tales grupos conectores comprenden o consisten de uno o más grupos funcionales disulfuro (S-S) como se representa en la Fórmula IV a continuación:



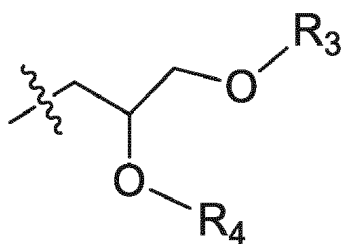
(IV),

en donde R₁ representa un grupo de cabeza hidrófilo (polar) y R₂ representa un grupo de cola lipófilo (no polar). En ciertas realizaciones, R₁ puede seleccionarse del grupo que consiste de imidazol, guanidinio, imina, enamina, amino, un alquil amino opcionalmente sustituido (por ejemplo, un alquil amino como dimetilamino) y un piridilo opcionalmente sustituido. En ciertas realizaciones, R₂ puede seleccionarse del grupo que consiste de:



(II),

y



(III);

en donde R₃ y R₄ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de un alquilo C₆-C₂₀ opcionalmente sustituido, variablemente saturado o insaturado y un acilo C₆-C₂₀ opcionalmente sustituido, variablemente saturado o insaturado. En ciertas realizaciones, n es 1 (de tal manera que el alquilo es etilo), 2 (de tal manera que el alquilo es metilo), 3 (de tal manera que el alquilo es, por ejemplo, propilo o isopropilo), 4 (de tal manera que el alquilo es, por ejemplo, butilo, iso-butilo, sec-butilo o ter-butilo), 5 (de tal manera que el alquilo es, por ejemplo, pentano), 6 (de tal manera que el alquilo es, por ejemplo, hexano), 7 (de tal manera que el alquilo es, por ejemplo, heptano), 8 (de tal manera que el alquilo es, por ejemplo, octano), 9 (de tal manera que el alquilo es, por ejemplo, nonano) o 10 (de tal manera que el alquilo es, por ejemplo, decano).

Como se usa en la presente para referirse a un lípido o un grupo conector, los términos "escindir" y "escindible" significan generalmente que uno o más enlaces químicos (por ejemplo, uno o más de enlaces covalentes, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals/o interacciones iónicas) entre átomos en o adyacentes al grupo conector disulfuro se rompen (reducen) o son capaces de romperse tras la exposición a un agente reductor seleccionado. En realizaciones, el grupo escindible es un grupo funcional disulfuro y, en realizaciones particulares, es un grupo disulfuro que es capaz de ser escindido tras la exposición a condiciones biológicas seleccionadas (por ejemplo, condiciones intracelulares). Por ejemplo, un grupo de función disulfuro puede escindirse enzimáticamente o mediante hidrólisis, o alternativamente tras la exposición a condiciones reductoras. Tras la escisión de dicho grupo funcional disulfuro, las uno o más fracciones o grupos funcionales (por ejemplo, un grupo de cabeza) que están unidos al mismo pueden liberarse. En realizaciones, el grupo escindible no es un grupo éster o un grupo éter.

Se han empleado grupos escindibles por enzimas para muchos sistemas de administración de fármacos y una gran parte de tales sistemas se ha realizado en el contexto de un profármaco. (Sherwood, R.F. Adv. Drug Del. Rev. 1996, 22, 269-288). En ciertas realizaciones, dichas enzimas también pueden emplearse para escindir uno o más grupos disulfuro de las composiciones divulgadas en la presente. Ejemplos de enzimas utilizadas en el contexto de profármacos y que también pueden emplearse para escindir uno o más grupos disulfuro pueden incluir, pero no se limitan a, tiorredoxina y tiol reductasa lisosomal inducible por gamma-interferón (GILT). Además, muchos grupos escindibles con enzimas están relacionados con el reconocimiento específico de una secuencia peptídica. Las secuencias escindibles con enzimas ejemplares contempladas (y su enzima correspondiente) incluyen, pero no se limitan a, dipéptido Val-Cit (catepsina B) (Toki, et al. J. Org. Chem. 2002, 67: 1866-1872; Yoneda, et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008, 18: 1632-1636), GFLG (catepsina B) (Nori et al. Bioconj. Chem. 2003, 14: 44-50; Veronese, et al. Bioconj. Chem. 2005, 16: 775-784), GGGF (catepsina B) (DeNardo, et al. Clin. Canc. Res. 2003, 9: 3665s-3972s), PVGLIG (MMP) (Chau, et al. J. Pharm. Sci. 2006, 95: 542-551), AAN (legumaina) (Stern et al. Bioconj. Chem. 2009, 20: 500-510).

En ciertas realizaciones, el grupo disulfuro escindible puede emplearse para liberar uno o más agentes de las composiciones divulgadas en la presente. Por ejemplo, se contempla el empleo de uno o más agentes o carga (por ejemplo, moléculas pequeñas, proteínas o ácidos nucleicos) tras la escisión de un grupo funcional disulfuro.

Los grupos escindibles descritos en la presente están unidos generalmente (por ejemplo, unidos por uno o más enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones iónicas y enlaces covalentes) a una o más fracciones o grupos funcionales (por lo menos un grupo de cabeza y por lo menos un grupo de cola). En ciertas realizaciones, por lo menos una de los fracciones o grupos funcionales es hidrófilo (un grupo de cabeza hidrófilo que comprende uno o más de imidazol, guanidinio, amino, imina, enamina, alquilamino opcionalmente sustituido y piridilo). Cuando las composiciones lipídicas de la presente divulgación se incorporan en una nanopartícula lipídica, la escisión del grupo conector disulfuro hace que el grupo de cabeza hidrófilo se disocie del lípido mientras que el grupo de cola lipófilo permanece como un componente fijo de la nanopartícula lipídica. Por ejemplo, como se ilustra en la FIG. 1 tras poner en contacto un lípido catiónico disulfuro (S-S) escindible con un agente reductor, el enlace disulfuro (S-S) se escinde y el grupo amino catiónico del lípido escindible se disocia de la nanopartícula lipídica, mientras que el grupo de cola lipófilo permanece como componente del vehículo liposomal. En la realización representada, la superficie de la nanopartícula lipídica resultante se neutraliza como resultado de la escisión del grupo conector disulfuro.

Las presentes invenciones contemplan la escisión del grupo conector disulfuro poniendo en contacto dicho grupo conector disulfuro con uno o más agentes reductores adecuados. Como se usa en la presente, el término "agente" se refiere a uno o más reactivos, compuestos o condiciones con las que (o con las cuales) los lípidos de la

presente divulgación pueden ponerse en contacto y/o interactuar para catalizar o inducir de otro modo la escisión de una o más grupos conectores. En ciertas realizaciones, el agente es un agente reductor que es capaz de donar electrones en una reacción de oxidación-reducción. Los agentes contemplados incluyen agentes reductores, por ejemplo, soluciones acuosas que comprenden uno o más de *tris*(2-carboxietil)fosfina (TCEP), β -mercaptoetanol (β -ME), ditioneitol (DTT), glutatión y ditioeritritol. En otras realizaciones, el agente reductor puede comprender una o más enzimas que son capaces de escindir enzimáticamente un grupo conector disulfuro. Preferiblemente, la selección de un agente reductor adecuado se basa en la naturaleza del grupo conector disulfuro escindible que comprende el lípido y está dentro de la competencia de un experto en la técnica. Por ejemplo, un lípido que comprende un grupo conector disulfuro que es susceptible de digestión enzimática puede ponerse en contacto o exponerse de otro modo a una enzima apropiada para facilitar la escisión del grupo conector disulfuro y la liberación del grupo de cabeza polar del lípido.

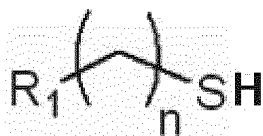
En ciertas realizaciones, un grupo conector disulfuro puede escindirse *in vitro* tras poner en contacto el lípido con un agente reductor apropiado (por ejemplo, una solución acuosa que comprende el agente reductor β -mercaptoetanol (β -ME)). Por ejemplo, una nanopartícula lipídica que comprende uno o más de los lípidos escindibles de la presente divulgación puede ponerse en contacto con un agente reductor inmediatamente después de cargarlo con uno o más agentes terapéuticos (por ejemplo, polinucleótidos que codifican una proteína o enzima funcional) y neutralizar de este modo la nanopartícula lipídica. Alternativamente, una nanopartícula lipídica que comprende uno o más lípidos escindibles puede ponerse en contacto con un agente reductor inmediatamente antes de la administración a un sujeto. Las nanopartículas lipídicas que tienen una carga superficial alta (por ejemplo, Z_{ave} de más de aproximadamente +30 mV o menos de aproximadamente -30 mV) se consideran a menudo más estables porque las cargas superficiales de las partículas sirven para repeler partículas cargadas de manera similar, reduciendo de este modo la probabilidad de que partículas cargadas de manera similar se agreguen entre sí. Retrasando la neutralización de la nanopartícula lipídica, de tal manera que la neutralización superficial se produzca inmediatamente antes de la administración de la nanopartícula lipídica a un sujeto (por ejemplo, en el plazo de menos de seis semanas, cuatro semanas, tres semanas, dos semanas, una semana o menos de setenta y dos horas, cuarenta y ocho horas, veinticuatro horas, dieciocho horas, doce horas, nueve horas, seis horas, tres horas, dos horas, una hora, treinta minutos, quince minutos, diez minutos, cinco minutos, un minuto o menos), la estabilidad de las nanopartículas lipídicas puede conservarse o prolongarse de otra manera. Cabe señalar que en ciertas realizaciones, el grado en el que se modifican las propiedades (por ejemplo, carga superficial) de una nanopartícula lipídica es una función de los agentes reductores seleccionados a los que se expone la nanopartícula lipídica y/o la duración de tal exposición.

Mientras que en algunas realizaciones descritas en la presente, los términos "modificado" y "modulado", en la medida que se relacionan con la carga superficial de una nanopartícula lipídica, se refieren a la neutralización de una nanopartícula lipídica (por ejemplo, Modular la Z_{ave} de tal manera que esté entre aproximadamente -2,5 mV y +2,5 mV), las presentes divulgaciones no necesitan limitarse a la neutralización. Más bien, se pretende que los términos "modificado" y "modulado" cuando se usan con respecto a la carga superficial de una nanopartícula lipídica se refieran en términos generales a cualquier cambio en las propiedades físicas o químicas de dicha nanopartícula lipídica (por ejemplo, modular una carga superficial positiva neta de una nanopartícula lipídica de tal manera que la carga superficial neta sea negativa). El agente reductor seleccionado y la duración de la exposición de la nanopartícula lipídica a dicho agente reductor representan dos variables importantes que pueden ser manipuladas por un experto en la técnica de tal manera que la carga superficial de la nanopartícula lipídica pueda modificarse o modularse en un grado deseado (por ejemplo, Z_{ave} de menos de aproximadamente -5 mV). Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la nanopartícula lipídica se pone en contacto con un agente reductor seleccionado durante una duración seleccionada suficiente para lograr el resultado deseado (por ejemplo, reducción de la carga superficial en por lo menos aproximadamente un 1-99%). En ciertas realizaciones, una nanopartícula lipídica puede ponerse en contacto con un agente reductor seleccionado durante entre aproximadamente cinco minutos y aproximadamente setenta y dos horas o más (por ejemplo, por lo menos aproximadamente quince minutos, treinta minutos, cuarenta y cinco minutos, una hora, tres horas, seis horas, ocho horas, doce horas, dieciséis horas, dieciocho horas, veinticuatro horas, cuarenta y ocho horas, setenta y dos horas o más) para lograr uno o más resultados deseados.

En ciertas realizaciones, hay una relación directa entre la duración de la exposición de la nanopartícula lipídica al agente reductor seleccionado y el cambio resultante en la carga superficial de la nanopartícula lipídica. Por ejemplo, al extender la duración de la exposición de una nanopartícula lipídica que tiene una carga superficial positiva neta a uno o más agentes reductores, la carga superficial resultante de dicha nanopartícula lipídica puede neutralizarse o reducirse en mayor grado (por ejemplo, reduciendo el potencial zeta medio a menos de aproximadamente -0,5 mV, -1,0 mV, -2,5 mV, -5,0 mV, -7,0 mV, -10,0 mV, -12,5 mV, -15,0 mV, -17,5 mV, -20 mV, -25 mV, -30 mV, -40 mV, -50 mV o menos). En algunas realizaciones, el grado en el que la carga superficial neta de una nanopartícula lipídica puede ser modulada mediante los métodos divulgados en la presente también puede ser una función de las propiedades de los componentes lipídicos que comprenden dicha nanopartícula lipídica (por ejemplo, uno o más lípidos auxiliares o lípidos derivatizados con PEG). Por consiguiente, la presente invención proporciona medios para controlar la carga superficial de nanopartículas lipídicas (y en particular nanopartículas lipídicas que encapsulan uno o más agentes terapéuticos) basándose, por ejemplo, en una o más propiedades físicas deseadas u órganos o tejidos objetivo. Lo anterior es particularmente útil no solo para facilitar el

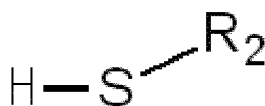
direccionamiento de nanopartículas lipídicas a células, tejidos u órganos específicos, sino que en ciertas realizaciones puede servir para mitigar las toxicidades asociadas con algunas nanopartículas lipídicas, y en particular nanopartículas lipídicas catiónicas. Por ejemplo, en algunas realizaciones reducir la carga superficial de las nanopartículas lipídicas divulgadas en la presente reduce las toxicidades asociadas con tales nanopartículas lipídicas minimizando la inmunogenicidad o minimizando los eventos asociados con la activación del complemento.

Tras poner en contacto el lípido con uno o más agentes reductores (por ejemplo, una solución acuosa que comprende por lo menos un agente reductor), el grupo conector disulfuro se escinde del lípido y se libera un grupo de cabeza hidrófilo, dejando el grupo de cola lipófilo (no polar) como componente de la nanopartícula lipídica. El lípido escindible comprende un grupo conector disulfuro (S-S), y tras la exposición a un agente reductor (por ejemplo, una solución acuosa de *tris*(2-carboxietil)fosfina (TCEP) y/o β -mercaptoetanol (β -ME)), se libera el grupo de cabeza hidrófilo representado por la estructura siguiente:



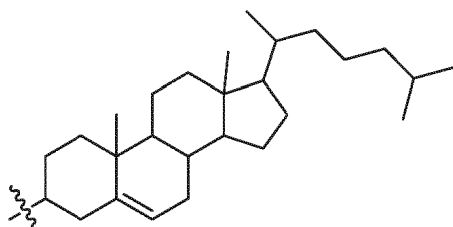
(V),

en donde R_1 representa el grupo de cabeza hidrófilo (por ejemplo, imidazol, guanidina, imina, enamina, amino, un alquil amino opcionalmente sustituido, y piridilo). De manera similar, después de la exposición del lípido, y en particular de un grupo conector disulfuro escindible que comprende el lípido, a uno o más agentes reductores, un grupo tiol, representado por la siguiente estructura, permanece como un componente fijo de la nanopartícula lipídica:



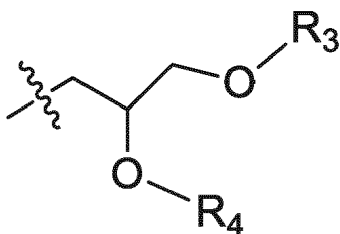
(VI),

en donde R_2 representa el grupo de cola y se selecciona del grupo que consiste de un piridilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, piridina o nitropiridilo) o una de las estructuras siguientes:



(II),

y



(III),

en donde R_3 y R_4 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de un alquilo C_6 - C_{20} opcionalmente sustituido, variablemente saturado o insaturado y un acilo C_6 - C_{20} opcionalmente sustituido, variablemente saturado o insaturado, permanece como un componente de la nanopartícula lipídica. Como se divulga en la FIG. 2, después de la exposición de la nanopartícula lipídica a un agente reductor, los grupos funcionales tiol restantes que recubren la superficie de la composición neutralizada pueden manipularse adicionalmente. Como se divulga en la FIG. 2, los grupos tiol representan sustratos que pueden hacerse reaccionar con otros compuestos orgánicos, polímeros, péptidos o ligandos para modificar aún más la superficie de la nanopartícula lipídica.

Los métodos divulgados en la presente proporcionan medios para preparar lípidos neutros o ligeramente

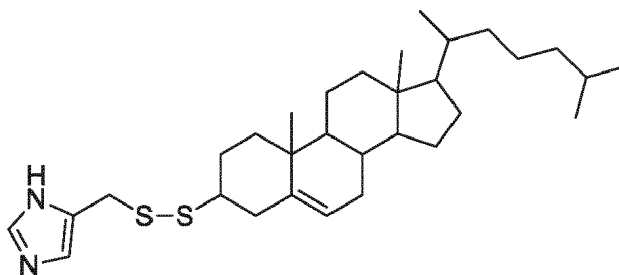
cargados que demuestran una alta eficacia de encapsulación. Como se usa en la presente, la frase "eficacia de encapsulación" se refiere a la fracción de agente terapéutico que se encapsula eficazmente dentro de un vehículo basado en liposomas con respecto a la fracción inicial de agente terapéutico presente en la fase lipídica. En realizaciones, las eficiencias de encapsulación altas se logran tras cargar la nanopartícula lipídica (por ejemplo, nanopartículas lipídicas que demuestran una carga superficial positiva) antes de poner en contacto dicha composición con un agente reductor. Cargando el vehículo liposomal en su estado cargado, se facilita la encapsulación de agentes terapéuticos cargados de manera opuesta. Por consiguiente, los compuestos lipídicos y los vehículos liposomales preparados a partir de los mismos se cargan con uno o más agentes terapéuticos antes de ponerlos en contacto con un agente reductor. En ciertas realizaciones, las composiciones lipídicas y las nanopartículas lipídicas preparadas a partir de las mismas muestran una eficiencia de encapsulación de por lo menos el 50% (por ejemplo, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 87,5%, 90%, 92,5%, 95%, 97,5%, 98%, 99% o más).

Las nanopartículas lipídicas preparadas de acuerdo con los métodos divulgados en la presente pueden caracterizarse con respecto a la concentración media de uno o más agentes terapéuticos encapsulados en tales composiciones. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la concentración media de agente terapéutico encapsulado en una nanopartícula lipídica preparada de acuerdo con la presente invención está entre aproximadamente 0,025 µg/ml y aproximadamente 250 µg/ml (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml o más).

En ciertas realizaciones, los lípidos y las nanopartículas lipídicas preparadas usando tales lípidos son estables. Como se usa en la presente para caracterizar una nanopartícula lipídica, el término "estable" se refiere a la estabilidad física de tales composiciones y generalmente significa que la composición es adecuada para la administración a un sujeto a la conclusión de un período de tiempo predeterminado y/o condiciones de almacenamiento (por ejemplo, después del almacenamiento a temperatura y humedad ambiente estándar durante por lo menos dos años). En ciertas realizaciones, la ausencia sustancial de un precipitado, turbidez y/u otra materia particulada (por ejemplo, después del almacenamiento a 45° C durante por lo menos dos meses) en la composición puede ser indicativa de su estabilidad. En otras realizaciones, la ausencia sustancial de agregación de partículas o coalescencia puede ser indicativa de la estabilidad de las nanopartículas lipídicas divulgadas en la presente.

En ciertas realizaciones, los compuestos lipídicos, y en particular los compuestos a base de imidazol descritos en la presente (por ejemplo, HGT4001 y HGT4004), también se caracterizan por su toxicidad reducida, en particular con respecto a los lípidos catiónicos tradicionales. En algunas realizaciones, las nanopartículas lipídicas descritas en la presente comprenden uno o más compuestos lipídicos catiónicos a base de imidazol, de tal manera que la concentración relativa de otros lípidos catiónicos más tóxicos en dicha nanopartícula lipídica puede reducirse o eliminarse de otra manera. Los compuestos o lípidos a base de imidazol (por ejemplo, HGT4001 y/o HGT4004) pueden usarse como el único lípido catiónico en una o más de las nanopartículas lipídicas descritas en la presente, o alternativamente pueden combinarse con lípidos catiónicos tradicionales (por ejemplo, LIPOFECTIN o LIPOFECTAMINE), lípidos no catiónicos, lípidos modificados con PEG y/o lípidos auxiliares. En ciertas realizaciones, las nanopartículas lipídicas pueden comprender una relación molar de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 90%, de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 70%, de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 50%, de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 40% del lípido total presente en tal nanopartícula lipídica, o preferiblemente de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 70% del lípido total presente en tal nanopartícula lipídica.

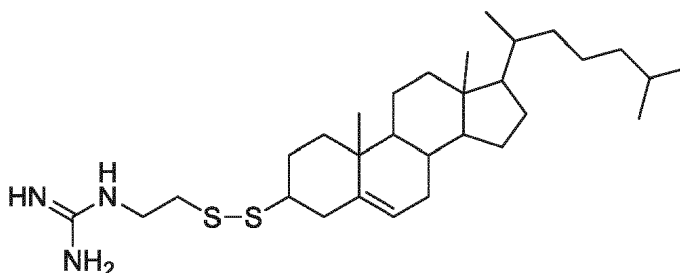
Los lípidos escindibles descritos en la presente, y en particular, el lípido escindible con disulfuro pueden consistir de uno o más de los compuestos lipídicos divulgados en la Solicitud de Estados Unidos de propiedad compartida N° 61/494.745 (WO 2012/170889 A1). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la invención 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]fenantren-3-il)disulfanil)metil)-1H-imidazol, que tiene la estructura de fórmula XI (referida en la presente como "HGT4001").



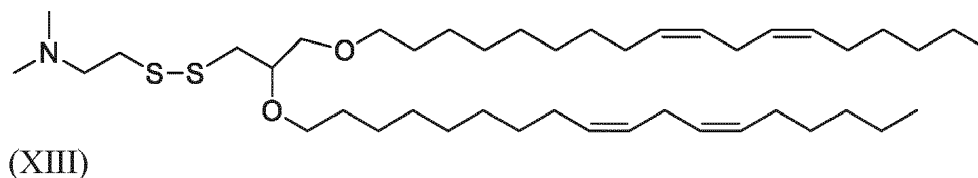
(XI)

En ciertas realizaciones, la invención 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]fenantren-3-il)disulfanil)etil)guanidina, que tiene la estructura de fórmula XII (referida en la presente como "HGT4002").

(XII)

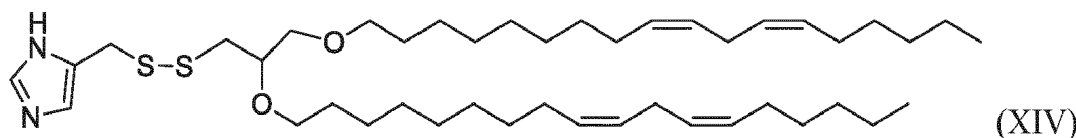


En otras realizaciones más, la invención se refiere al compuesto 2-((2,3-Bis((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi)propil)disulfanil)-N,N-dimetiletanamina, que tiene la estructura de fórmula XIII (referido en la presente como "HGT4003").



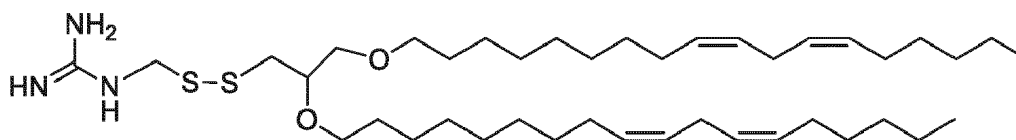
(XIII)

En otras realizaciones, la invención 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 XIV (referido en la presente como "HGT4004").



(XIV)

En otras realizaciones más, la invención 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 XV (referido en la presente como "HGT4005").



(XV)

Los compuestos lipídicos descritos en la presente pueden usarse para construir nanopartículas lipídicas que facilitan o mejoran la administración y liberación de materiales encapsulados (por ejemplo, uno o más polinucleótidos terapéuticos) a una o más células objetivo (por ejemplo, permeando o fusionando con las membranas lipídicas de tales células objetivo). En ciertas realizaciones, los compuestos descritos en la presente se caracterizan por tener una o más propiedades que proporcionan ventajas a tales compuestos con respecto a otros lípidos clasificados de manera similar. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los lípidos divulgados en la presente permiten el control y la adaptación de las propiedades físicas de las nanopartículas lipídicas de las que son un componente. En particular, la carga superficial de las nanopartículas lipídicas que comprenden los compuestos lipídicos divulgados en la presente puede personalizarse fácilmente en base a las enseñanzas proporcionadas en la presente. Por ejemplo, la carga superficial de la nanopartícula lipídica se vuelve neutra tras la exposición a un agente reductor apropiado (por ejemplo, un agente reductor como TCEP). Tal modificación puede emplearse como un medio para modular las propiedades farmacocinéticas de una nanopartícula lipídica (por ejemplo, mejorando la vida media circulatoria o facilitando la distribución de dicha composición a una o más células, órganos o tejidos objetivo). En ciertas realizaciones, los compuestos lipídicos y las nanopartículas lipídicas neutralizadas divulgadas en la presente muestran una capacidad mejorada (por ejemplo, aumentada) para transfectar una o más células objetivo. Como se usa en la presente, los términos "transfectar" o "transfección" se refieren a la introducción intracelular de uno o más materiales encapsulados (por ejemplo, ácidos nucleicos y/o polinucleótidos) en una célula,

o preferiblemente en una célula objetivo.

Los lípidos y las nanopartículas lipídicas de la presente invención pueden usarse en métodos para facilitar la administración de una amplia variedad de materiales y agentes terapéuticos a células, órganos y tejidos objetivo. Por consiguiente, los lípidos y las nanopartículas lipídicas descritos en la presente pueden usarse para encapsular cualquier número de materiales adecuados para la administración intracelular. En ciertas realizaciones, tales materiales encapsulados son capaces de conferir un beneficio terapéutico o de diagnóstico a las células en las que se administran dichos materiales y pueden incluir cualquier fármaco, agente biológico y/o de 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 nanopartículas lipídicas descritas en la presente pueden comprender o encapsular de otra manera más de un tipo de material, por ejemplo, dos o más secuencias de polinucleótidos diferentes que codifican una proteína, una enzima y/o un esteroide. En ciertas realizaciones, los materiales encapsulados son uno o más polinucleótidos y ácidos nucleicos.

Como se usa en la presente, los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan indistintamente para referirse a material genético (por ejemplo, ADN o ARN), y cuando tales términos se usan con respecto a los compuestos lipídicos y nanopartículas lipídicas descritos en la presente, se refieren generalmente al material genético encapsulado por dichos compuestos y nanopartículas lipídicas. En algunas realizaciones, el polinucleótido es ARN. El ARN adecuado incluye ARNm, ARNip, ARNmi, ARNsno y ARNsno. Los polinucleótidos contemplados también incluyen ARN no codificante intergénico grande (ARNlinc), que generalmente no codifica proteínas, sino que funciona, por ejemplo, en la señalización inmunológica, la biología de las células madre y el desarrollo de enfermedades. (Ver, por ejemplo, Guttman, et al., 458: 223-227 (2009); y Ng, et al., Nature Genetics 42: 1035-1036 (2010)). En ciertas realizaciones, los polinucleótidos encapsulados por los compuestos lipídicos o nanopartículas lipídicas de acuerdo con la invención incluyen ARN o ARN estabilizado que codifica una proteína o enzima (por ejemplo, ARNm que codifica alfa galactosidasa A o receptores de lipoproteínas de baja densidad). La presente invención contempla el uso de tales polinucleótidos (y en particular ARN o ARN estabilizado) como un agente terapéutico que es capaz de ser expresado por células objetivo para facilitar de este modo la producción (y en ciertos casos la excreción) de una enzima o proteína funcional por tales células objetivo como se divulga, por ejemplo, en la Solicitud Internacional N° PCT/US2010/058457 y en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos N° 61/494.881 (WO 2012/170930 A1), presentada el 8 de junio de 2011. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, tras la expresión de uno o más polinucleótidos por las células objetivo, puede observarse la producción de una enzima o proteína funcional o biológicamente activa en la que es deficiente un sujeto (por ejemplo, una enzima del ciclo de la urea o una enzima asociada con un trastorno del almacenamiento lisosomal).

También se contemplan las modificaciones de polinucleótidos o ácidos nucleicos. Como se usa en la presente para describir uno o más polinucleótidos o ácidos nucleicos descritos en la presente (por ejemplo, ARNm), los términos "modificación" y "modificado", según se relacionan dichos términos con los polinucleótidos o ácidos nucleicos divulgados en la presente, se refieren a uno o más cambios, alteraciones o sustituciones que mejoran o potencian la estabilidad y/o expresión (por ejemplo, traducción) de tales polinucleótidos o ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNm) incluyendo, por ejemplo, la inclusión de secuencias que funcionan en el inicio de la traducción de proteínas (por ejemplo, la secuencia de consenso de Kozac). (Kozak, M., Nucleic Acids Res 15 (20): 8125-48 (1987)). En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos han experimentado una modificación química o biológica que les hace más estables. Las modificaciones ejemplares de un ácido nucleico incluyen el agotamiento de una base (por ejemplo, por delección o por la sustitución de un nucleótido por otro) o modificación de una base, por ejemplo, la modificación química de una base. La frase "modificaciones químicas", como se usa en la presente para describir los ácidos nucleicos o polinucleótidos, se refiere a modificaciones que introducen químicas que difieren de las observadas en los ácidos nucleicos de origen natural, por ejemplo, modificaciones covalentes como la introducción de nucleótidos modificados (por ejemplo, análogos de nucleótidos, o la inclusión de grupos colgantes que no se encuentran de manera natural en tales moléculas de ácido nucleico). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los polinucleótidos divulgados en la presente (por ejemplo, un polinucleótido de ARNm) puede comprender por lo menos un nucleótido modificado o modificado químicamente seleccionado independientemente del grupo que consiste de 5-metilcitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, pseudouridina, 2-tiouridina, diaminopurina y 2-cloro-6-aminopurina citosina.

Además, las modificaciones de polinucleótidos adecuadas incluyen alteraciones en uno o más nucleótidos de un codón, de tal manera que el codón codifica el mismo aminoácido pero es más estable que el codón encontrado en la versión de tipo salvaje del ácido nucleico. 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 descubierto que el ARN desprovisto de residuos C y U es estable para la mayoría de las RNAsas. (Heidenreich, et al. J Biol Chem 269, 2131-8 (1994)). En algunas realizaciones, se reduce el número de residuos de 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 en los ácidos nucleicos del ARNm también incluyen la incorporación de pseudouridinas. La incorporación de pseudouridinas en los ácidos nucleicos del ARNm puede mejorar la estabilidad

y la capacidad de traducción, así como disminuir la inmunogenicidad *in vivo*. (Ver, por ejemplo, Kariko, K., et al., Molecular Therapy 16 (11): 1833-1840 (2008)). Las sustituciones y modificaciones de los ácidos nucleicos pueden realizarse mediante métodos fácilmente conocidos por un experto en la técnica.

Las limitaciones para reducir el número de residuos de C y U en una secuencia probablemente serán mayores dentro de la región codificante de un ARNm, en comparación con una región no traducida, (es decir, probablemente no será posible eliminar todos los residuos de C y U presente en el mensaje sin dejar de conservar la capacidad del mensaje para codificar la secuencia de aminoácidos deseada). Sin embargo, la degeneración del código genético presenta una oportunidad para permitir que se reduzca el número de residuos 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 de Gly pueden alterarse a GGA o GGG en lugar de GGU o GGC.

El término modificación también incluye, por ejemplo, la incorporación de enlaces no nucleotídicos o nucleótidos modificados en las secuencias de ácidos nucleicos (por ejemplo, modificaciones en uno o ambos extremos 3' y 5' de una molécula de ARNm que codifica una proteína o enzima funcional). Tales modificaciones incluyen la adición de bases a una secuencia de ácidos nucleicos (por ejemplo, la inclusión de una cola de poli A o una cola de poli A más larga), la alteración de la UTR 3' o la UTR 5', complejando el ácido nucleico con un agente (por ejemplo, una proteína o una molécula de ácido nucleico complementaria) y la inclusión de elementos que cambian la estructura de una molécula de ácido nucleico (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 una realización, puede añadirse una cola de poli A larga a una molécula de ARNm, haciendo por tanto que el ARN sea más estable. Las colas poli A pueden añadirse usando una variedad de técnicas reconocidas en la técnica. Por ejemplo, pueden añadirse colas poli A largas a ARN sintético o transcrito *in vitro* usando poli A polimerasa (Yokoe, et al. Nature Biotechnology. 1996; 14: 1252-1256). Un vector de transcripción también puede codificar colas poli A largas. Además, pueden añadirse colas de poli A mediante transcripción directamente a partir de productos de PCR. El poli A también puede ligarse al extremo 3' de un ARN de sentido con ARN ligasa (ver, por ejemplo, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2ª edición, ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: edición de 1991)). En una realización, la longitud de la cola de poli A es de por lo menos aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 75, 80, 90, 100, 200, 300, 400 o por lo menos aproximadamente 500 nucleótidos. En una realización, la longitud de la cola de poli A se ajusta para controlar la estabilidad de una molécula de ARNm de sentido modificada y, por tanto, la transcripción de la proteína. Por ejemplo, como la longitud de la cola de poli A puede influir en la vida media de una molécula de ARNm de sentido, la longitud de la cola de poli A puede ajustarse para modificar el nivel de resistencia del ARNm a las nucleasas y controlar de este modo el transcurso del tiempo de la expresión de proteínas en una célula. En una realización, las moléculas de ácidos nucleicos estabilizadas son suficientemente resistentes a la degradación *in vivo* (por ejemplo, por nucleasas), de tal manera que pueden administrarse a la célula objetivo sin un vehículo de transferencia.

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

También se contemplan otras modificaciones a las secuencias de ácidos nucleicos realizadas en uno o ambos extremos 3' y 5' del ácido nucleico. Por ejemplo, la presente divulgación contempla modificaciones en uno o ambos de los extremos 3' y 5' de los ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNm) que incluyan por lo menos una secuencia parcial de un gen inmediato-temprano 1 (IE1) de CMV, o un fragmento del mismo para mejorar la resistencia a nucleasas y/o mejorar la vida media del ácido nucleico. Además de aumentar la estabilidad de la secuencia de ácidos nucleicos del ARNm, se ha descubierto sorprendentemente que la inclusión de una secuencia parcial de un gen inmediato- temprano 1 (IE1) de CMV en el extremo 5' mejora la traducción del ARNm y la expresión de la proteína o enzima funcional. También se contempla la inclusión de una secuencia que codifica la hormona del crecimiento humana (hGH), o un fragmento de la misma en uno o ambos extremos 3' y 5' del ácido nucleico (por ejemplo, ARNm) para estabilizar adicionalmente el ácido nucleico. Generalmente, las modificaciones preferidas mejoran la estabilidad y/o las propiedades farmacocinéticas (por ejemplo, la vida media) del ácido nucleico con respecto a sus contrapartidas no modificadas e incluyen, por ejemplo, modificaciones realizadas para mejorar la resistencia de dicho ácido nucleico a la digestión de nucleasas *in vivo*.

En ciertas realizaciones, la modificación de polinucleótidos contemplada incluye cambios en los nucleótidos para incorporar un fracción de azúcar que tiene un grupo sustituyente 2' o que incorpora una estructura de ácido nucleico con puente o bloqueado (LNA) que puede proporcionar una resistencia a nucleasas aumentada. En algunas

realizaciones, una modificación preferida comprende la inclusión de uno o más LNA, como oxi-LNA (como beta-D-oxi-LNA y alfa-L-oxi-LNA) y/o amino-LNA (como beta-D-amino-LNA y alfa-L-amino-LNA) y/o tio-LNA (como beta-D-tio-LNA y alfa-L-tio-LNA) y/o ENA (como beta-D-ENA y alfa-L-ENA). Siendo el más preferido beta-D-oxi-LNA.

En algunas realizaciones, las modificaciones de polinucleótidos se seleccionan independientemente de, por ejemplo: unidades de 2'-O-alkil-ARN, unidades de 2'-amino-ADN, unidades de 2'-fluoro-ADN, unidades de LNA, unidades de ácido arabinucleico (ANA), Unidades 2'-fluoro-ANA, unidades de HNA, unidades de INA (unidades de ácido nucleico intercalado como se analiza por Christensen, et al., Nucl. Acids. Res. (2002) 30: 4918-4925) y de 2'MOE. En algunas realizaciones, solo hay uno de los tipos anteriores de modificaciones presentes en el oligonucleótido. En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende solo nucleótidos de LNA y nucleótidos de origen natural (como ARN), opcionalmente con uno o más enlaces internucleotídicos modificados como fosforotioato.

Los monómeros de nucleótidos de los polinucleótidos (por ejemplo, ARNm) descritos en la presente se acoplan entre sí mediante grupos de enlace. Adecuadamente, cada monómero de nucleótidos está enlazado al monómero adyacente 3' mediante un grupo de enlace. El experto en la técnica entenderá que, en el contexto de la presente divulgación, el monómero 5' al final de un oligonucleótido no comprende un grupo de enlace 5', aunque puede comprender o no un grupo terminal 5'.

Como se usa en la presente, las frases "grupo de enlace" y "enlace internucleotídico" se pretende que signifiquen un grupo capaz de acoplar covalentemente dos nucleótidos entre sí. Los ejemplos específicos y preferidos incluyen grupos fosfato y grupos fosforotioato. En ciertas realizaciones, los polinucleótidos divulgados en la presente tienen enlaces internucleotídicos de fosforotioato en cada enlace internucleotídico. Los monómeros de nucleótidos del polinucleótido o la secuencia de nucleótidos contigua del mismo se acoplan entre sí mediante grupos de enlace. Adecuadamente, cada nucleótido está enlazado al nucleótido adyacente 3' mediante un grupo de enlace. Los enlaces internucleotídicos adecuados incluyen los enumerados en la Solicitud Internacional WO 2007/031091, por ejemplo, los enlaces internucleotídicos enumerados en el primer párrafo de la página 34 de la WO2007/031091.

En ciertas realizaciones, los compuestos lipídicos y las nanopartículas lipídicas descritos en la presente se formulan como una formulación o composición mezclada. Por ejemplo, en una realización, una nanopartícula lipídica comprende una formulación mezclada que comprende una proporción 3:1 de una primera nanopartícula lipídica que comprende HGT4003 y una segunda nanopartícula lipídica que comprende HGT4001. Por consiguiente, también se proporcionan en la presente nanopartículas lipídicas mezcladas y métodos relacionados para modular la expresión de un polinucleótido en una o más células y tejidos objetivo, como se divulga, por ejemplo, en la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 61/494.714, presentada el 8 de junio de 2011. También se contemplan métodos para modular (por ejemplo, aumentar o aumentar sinérgicamente) la producción y/o secreción de, por ejemplo, uno o más polipéptidos funcionales, proteínas o enzimas que están codificadas por uno o más polinucleótidos (por ejemplo, ARNm) encapsulados en tales nanopartículas lipídicas mezcladas por una o más células objetivo, como también se divulga en la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 61/494.714.

En ciertas realizaciones, los lípidos y las nanopartículas lipídicas proporcionadas en la presente son capaces de modular la expresión de ácidos nucleicos y polinucleótidos expresados de manera aberrante en una o más células y tejidos objetivo. Por consiguiente, también se proporcionan en la presente nanopartículas lipídicas neutras que tienen uno o más agentes terapéuticos encapsulados para su uso en métodos de tratamiento de enfermedades en un sujeto administrando una cantidad eficaz de las nanopartículas lipídicas preparadas de acuerdo con la presente invención al sujeto. En ciertas realizaciones, tales métodos pueden potenciar (por ejemplo, aumentar) la expresión de un polinucleótido y/o incrementar la producción y secreción de un producto de polipéptidos funcional en una o más células y tejidos objetivo (por ejemplo, hepatocitos). En algunas realizaciones, las células o tejidos objetivo expresan de manera aberrante el polinucleótido encapsulado por uno o más de los compuestos lipídicos o nanopartículas lipídicas descritos en la presente. También se proporcionan en la presente nanopartículas lipídicas neutras que tienen uno o más agentes terapéuticos encapsulados para su uso en métodos para aumentar la expresión de uno o más polinucleótidos (por ejemplo, ARNm) en una o más células, tejidos y órganos objetivo. Por lo general, tales métodos comprenden poner en contacto las células objetivo con uno o más lípidos y/o nanopartículas lipídicas que comprenden o encapsulan de otro modo uno o más polinucleótidos.

Los compuestos divulgados en la presente se usan como componente lipídico (por ejemplo, lípido catiónico) de una nanopartícula lipídica. Estas nanopartículas lipídicas se usan para encapsular materiales y facilitar la administración de tales materiales a una o más células, tejidos y órganos objetivo. Como se usa en la presente, el término "liposoma" se refiere de manera general a una vesícula compuesta de lípidos (por ejemplo, lípidos anfifílicos) dispuestos en una o más bicapas esféricas o bicapas. En realizaciones, el liposoma es una nanopartícula lipídica (por ejemplo, una nanopartícula lipídica que comprende uno o más de los compuestos lipídicos catiónicos divulgados en la presente). Tales liposomas pueden ser vesículas unilaminares o multilaminares que tienen una membrana formada a partir de un material lipófilo y un interior acuoso que contiene los materiales encapsulados (por ejemplo, polinucleótidos) a ser administrados a una o más células, tejidos y órganos objetivo. Los ejemplos de lípidos adecuados (por ejemplo, lípidos catiónicos) que pueden usarse para formar las nanopartículas lipídicas contempladas en la presente incluyen uno o más de los compuestos divulgados en la presente (por ejemplo,

HGT4001, HGT4002, HGT4003, HGT4004 y/o HGT4005). Tales nanopartículas lipídicas también pueden comprender lípidos catiónicos adicionales como C12-200, DLin-KC2-DMA, DOPE, DMG-PEG-2000, lípidos no catiónicos, lípidos a base de colesterol, lípidos auxiliares, lípidos PEG-modificados, así como los compuestos de fosfatidilo (por ejemplo, fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrosidos y gangliósidos) y combinaciones o mezclas de los anteriores.

Se han descrito varios lípidos catiónicos en la bibliografía, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. En ciertas realizaciones, tales lípidos catiónicos se incluyen en las nanopartículas lipídicas descritas en la presente además de uno o más de los compuestos o lípidos divulgados en la presente (por ejemplo, HGT4003). En algunas realizaciones, se usa el lípido catiónico cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxy)propil]-N,N,N-trimetilamonio o "DOTMA". (Felgner et al. (Proc. Natl Acad. Sci. 84, 7413 (1987); Patente de Estados Unidos N° 4.897.355). El DOTMA puede formularse solo o puede combinarse con dioleoilfosfatidiletanolamina o "DOPE" u otros lípidos catiónicos o no catiónicos en una nanopartícula lipídica. Otros lípidos catiónicos adecuados incluyen, por ejemplo, C12-200, 5-carboxiespermiilglicinodioctadecilamida o "DOGS", 2,3-dioleiloxy-N-[2(esperminacarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio o "DOSPA" (Behr et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. 86, 6982 (1989); Patente de Estados Unidos N° 5.171.678; Patente de Estados Unidos N° 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-diesteariloxy-N,N-dimetil-3-aminopropano o "DSDMA", 1,2-dioleiloxy-N,N-dimetil-3-aminopropano o "DODMA", 1,2-dilinoileiloxy-N,N-dimetil-3-aminopropano o "DLinDMA", 1,2-dilinoileniloxy-N,N-dimetil-3-aminopropano o "DLenDMA", cloruro de N-dioleil-N,N-dimetilamonio o "DODAC", bromuro de N,N-diestearil-N, N-dimetilamonio o "DDAB", bromuro de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxiethylamonio o "DMRIE", 3-dimetilamino-2-(colest-5-en-3-beta-oxibutan-4-oxi)-1-(cis, cis-9,12-octadecadienoxy)propano o "CLinDMA", 2-[5'-(colest-5-en-3-beta-oxi)-3'-oxapentoxi]-3-dimetil 1-1-(cis,cis-9',1'-2'-octadecadienoxy)propano o "CpLinDMA", N,N-dimetil-3,4-dioleiloxibencilamina o "DMOBA", 1,2-N,N'-dioleilcarbamil-3-dimetilaminopropano o "DOcarbDAP", 2,3-dilinoileiloxy-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 de PCT WO2005/121348A1). También se contempla el uso de lípidos catiónicos a base de colesterol para formular las nanopartículas lipídicas. Tales lípidos catiónicos a base de colesterol pueden usarse, ya sea solos o en combinación con otros lípidos catiónicos o no catiónicos. Los lípidos catiónicos a base de colesterol adecuados incluyen, por ejemplo, DC-Chol (N,N-dimetil-N-etilcarboxamidocolesterol), 1,4-bis(3-N-oleilaminopropil)piperazina (Gao, et al. Biochem. Biophys Res. Comm. 179, 280 (1991), Wolf et al., BioTechniques 23, 139 (1997); Patente de Estados Unidos N° 5.744.335).

Además, se encuentran disponibles comercialmente varios reactivos para potenciar la eficacia de la transfección. Los ejemplos adecuados incluyen LIPOFECTIN (DOTMA:DOPE) (Invitrogen, Carlsbad, Calif), LIPOFECTAMINE (DOSPA:DOPE) (Invitrogen), LIPOFECTAMINE2000. (Invitrogen), FUGENE, TRANSFECTAM (DOGS) y EFFECTENE. También se contemplan lípidos catiónicos 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-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo o "ICE", como se divulga en la Solicitud Internacional N° PCT/US2010/058457.

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

También pueden usarse lípidos no catiónicos en una o más de las nanopartículas lipídicas. Tales lípidos no catiónicos se usan preferiblemente en combinación con uno o más de los compuestos y lípidos divulgados en la presente. Como se usa en la presente, la frase "lípido no catiónico" se refiere a cualquier lípido neutro, zwitteriónico aniónico. Como se usa en la presente, la frase "lípido aniónico" se refiere a cualquiera de una serie de especies de lípidos que llevan una carga neta negativa a un pH seleccionado, como pH fisiológico. Los 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), dioleoilfosfatidiletanolamina 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (DOPE-mal), dipalmitoil fosfatidil etanolamina (DPPE), dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE), diestearoilfosfatidil-etanolamina (DSPE), DLPE (1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DPPS (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina), 16-O-monometil PE, 16-O-dimetil PE, 18-1-trans PE, 1-estearoil-2-oleoil-fosfatidietanolamina (SOPE), ceramidas, esfingomielinas, colesterol, o una mezcla de los mismos. Tales lípidos no catiónicos pueden usarse solos, pero preferiblemente se usan en combinación con otros excipientes, por ejemplo, uno o más de los lípidos catiónicos divulgados en la presente (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 del 5% a aproximadamente el 90%, o preferiblemente de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 70% del lípido total presente en la nanopartícula lipídica.

También se contempla la inclusión de polímeros en las nanopartículas lipídicas descritas en la presente. Los polímeros adecuados pueden incluir, por ejemplo, poliacrilatos, polialquilcianoacrilatos, polilactida, copolímeros de polilactida-policiglicólido, policaprolactonas, dextrano, albúmina, gelatina, alginato, colágeno, quitosano, ciclodextrinas y polietilenimina. Tales polímeros pueden usarse solos, pero preferiblemente se usan en combinación con otros excipientes, por ejemplo, uno o más de los lípidos catiónicos divulgados en la presente (por ejemplo, HGT4001, HGT4002, HGT4003, HGT4004 y/o HGT4005).

En ciertas realizaciones, las nanopartículas lipídicas se formulan y modifican para facilitar la transfección (por ejemplo, de un polinucleótido) de una célula objetivo. En otra realización, las nanopartículas lipídicas pueden seleccionarse, prepararse y neutralizarse para optimizar la administración de polinucleótidos a una célula, tejido u órgano objetivo. Por ejemplo, si la célula objetivo es un hepatocito, las propiedades de las nanopartículas lipídicas (por ejemplo, tamaño, carga superficial y/o pH) pueden optimizarse para administrar eficazmente tales nanopartículas lipídicas a la célula u órgano objetivo, reducir la depuración inmunológica y/o promover la retención en ese órgano objetivo. Alternativamente, si el tejido objetivo es el sistema nervioso central, la selección y preparación de las nanopartículas lipídicas debe considerar la penetración de, y la retención dentro de la barrera hematoencefálica y/o el uso de medios alternativos para administrar directamente tales nanopartículas lipídicas a dicho tejido objetivo (por ejemplo, mediante administración intracerebrovascular o intratecal). En ciertas realizaciones, las nanopartículas lipídicas descritas en la presente pueden combinarse con un complejo que facilita la transferencia de materiales encapsulados (por ejemplo, un complejo que interrumpe o mejora la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y, por lo tanto, mejora la transferencia de tales polinucleótidos encapsulados a las células objetivo). Aunque las nanopartículas lipídicas descritas en la presente pueden facilitar la introducción de materiales encapsulados como uno o más polinucleótidos en las células objetivo, la adición de policationes (por ejemplo, poli L-lisina y protamina) a, por ejemplo, una o más de las nanopartículas lipídicas que comprenden las nanopartículas lipídicas como un copolímero también pueden facilitar, y en algunos casos mejorar notablemente la eficiencia de transfección de varios tipos de liposomas catiónicos en 2-28 veces en una serie de líneas celulares tanto *in vitro* como *in vivo*. (Ver, N.J. Caplen, et al., Gene Ther. 1995; 2: 603; S. Li, et al., Gene Ther. 1997; 4, 891.)

Las nanopartículas lipídicas se preparan para encapsular uno o más materiales o agentes terapéuticos (por ejemplo, polinucleótidos). Al proceso de incorporar un agente terapéutico deseado (por ejemplo, ARNm) en un liposoma o una nanopartícula lipídica se hace referencia en la presente como "carga" o "encapsulación" (Lasic, et al., FEBS Lett., 312: 255-258, 1992). Los materiales cargados o encapsulados con nanopartículas lipídicas (por ejemplo, polinucleótidos) pueden estar localizados total o parcialmente en el espacio interior de la nanopartícula lipídica, dentro de la membrana bicapa de la nanopartícula lipídica o asociados con la superficie exterior de la nanopartícula lipídica.

Cargar o encapsular, por ejemplo, un polinucleótido en una nanopartícula lipídica puede servir para proteger el polinucleótido de un entorno que puede contener enzimas o sustancias químicas (por ejemplo, suero) que degradan tales polinucleótidos y/o sistemas o receptores que provocan la excreción rápida de tales polinucleótidos. Por consiguiente, en algunas realizaciones, las composiciones descritas en la presente son capaces de mejorar la estabilidad del polinucleótido o polinucleótidos encapsulados por las mismas, particularmente con respecto a los entornos a los que se expondrán tales polinucleótidos. Encapsular materiales, como por ejemplo polinucleótidos en una o más de las nanopartículas lipídicas descritas en la presente, también facilita la administración de tales polinucleótidos en las células y tejidos objetivo. En realizaciones, las nanopartículas lipídicas descritas en la presente se cargan con uno o más agentes terapéuticos antes de ser neutralizadas.

En ciertas realizaciones, las nanopartículas lipídicas descritas en la presente se preparan combinando múltiples componentes lipídicos (por ejemplo, uno o más de los compuestos lipídicos divulgados en la presente) con uno o más componentes poliméricos. Por ejemplo, puede prepararse una nanopartícula lipídica usando HGT4003, DOPE, CHOL y DMG-PEG2000. Una nanopartícula lipídica puede estar compuesta por combinaciones de lípidos adicionales a varias proporciones incluyendo, por ejemplo, HGT4001, DOPE y DMG-PEG2000. La selección de lípidos catiónicos, lípidos no catiónicos y/o lípidos PEG-modificados que comprenden las nanopartículas lipídicas, así

como la relación molar relativa de dichos lípidos entre sí, se basa en las características del lípido o lípidos seleccionados, la naturaleza de las células o tejidos objetivo previstos y las características de los materiales o polinucleótidos a ser administrados por la nanopartícula lipídica. Las consideraciones adicionales incluyen, por ejemplo, la saturación de la cadena de alquilo, así como el tamaño, la carga superficial, el pH, pKa, fusiogenicidad y toxicidad del lípido o lípidos seleccionados.

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

Durante la preparación de las nanopartículas lipídicas descritas en la presente, los agentes portadores 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 mediante su inclusión en la formulación lipídica. En el caso de ciertas moléculas (por ejemplo, polinucleótidos lipófilos catiónicos o aniónicos), la carga del polinucleótido en nanopartículas lipídicas o liposomas preformados puede realizarse, por ejemplo, mediante los métodos descritos en la Patente de Estados Unidos Nº 4.946.683. Después de la encapsulación del polinucleótido, las nanopartículas lipídicas pueden procesarse para eliminar el ARNm no encapsulado mediante procesos como cromatografía en gel, diafiltración o ultrafiltración. Por ejemplo, si se desea eliminar el polinucleótido unido externamente de la superficie de las nanopartículas lipídicas descritas en la presente, tales nanopartículas lipídicas pueden someterse a una columna de dietilaminoetil SEPHACEL.

Existen varios métodos para reducir el tamaño, o "dimensionamiento", de las nanopartículas lipídicas divulgadas en la presente, y cualquiera de estos métodos puede emplearse generalmente cuando se usa dimensionamiento como parte de la invención. El método de extrusión es un método de dimensionamiento de liposomas. (Hope, MJ et al. Reducción del tamaño de los liposomas y preparación de vesículas unilaminares mediante técnicas de extrusión. En: Liposome Technology (G. Gregoriadis, Ed.) Vol. 1. p 123 (1993).)). El método consiste de 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 logra la distribución de tamaño de liposoma deseada. Los liposomas pueden extruirse a través de membranas de poros sucesivamente más pequeños para lograr una reducción gradual del tamaño de los liposomas.

Hay disponibles una variedad de métodos alternativos conocidos en la técnica para el dimensionamiento de una población de nanopartículas lipídicas. Uno de tales métodos de dimensionamiento se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 4.737.323. La sonicación de una suspensión de nanopartículas de liposomas o lípidos mediante sonicación en baño o sonda produce una reducción progresiva del tamaño hasta una ULV pequeña de menos de aproximadamente 0,05 micras de diámetro. La homogeneización es otro método que se basa en la energía de corte para fragmentar liposomas grandes en otros más pequeños. En un procedimiento de homogeneización típico, las MLV se hacen recircular a través de un homogeneizador de emulsión estándar hasta que se observan los tamaños de liposomas seleccionados, típicamente entre aproximadamente 0,1 y 0,5 micras. El tamaño de las nanopartículas lipídicas puede determinarse mediante dispersión de luz cuasi eléctrica (QELS) como se describe en Bloomfield, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 10: 421-450 (1981). El diámetro medio de las nanopartículas lipídicas puede reducirse mediante sonicación de las nanopartículas lipídicas formadas. Los ciclos de sonicación intermitente pueden alternarse con la evaluación QELS para guiar la síntesis de liposomas eficaz.

La selección del tamaño apropiado de las nanopartículas lipídicas descritas en la presente debe tener en cuenta el sitio de la célula o tejido objetivo y, hasta cierto punto, la aplicación para la que se está haciendo la nanopartícula lipídica. Como se usa en la presente, la frase "célula objetivo" se refiere a células a las que deben dirigirse o son el objetivo de una o más de las nanopartículas lipídicas descritas en la presente. En algunas realizaciones, las células objetivo comprenden un tejido u órgano particular. En algunas realizaciones, las células objetivo son deficientes en una proteína o enzima de interés. Por ejemplo, cuando se desea administrar un polinucleótido a un hepatocito, el hepatocito representa la célula objetivo. Las nanopartículas lipídicas (y, por ejemplo, los materiales polinucleotídicos encapsulados en las mimas) pueden usarse para transfectar las células objetivo de forma discriminatoria (es decir, no transfectan células no objetivo). Las composiciones pueden prepararse para dirigirse preferentemente a una variedad de células objetivo, que incluyen, pero no se limitan a, hepatocitos, células hematopoyéticas, células epiteliales, células endoteliales, células pulmonares, células óseas, células madre, células mesenquimales, células neurales (por ejemplo, meninges, astrocitos, neuronas motoras, células de los ganglios de la raíz dorsal y neuronas motoras del asta anterior), células fotorreceptoras (por ejemplo, bastones y conos), células epiteliales pigmentadas retinianas, células secretoras, células cardíacas, adipocitos, células del músculo liso vascular, cardiomiocitos, células del músculo esquelético, células beta, células pituitarias,

células del revestimiento sinovial, células de ovario, células testiculares, fibroblastos, células B, células T, reticulocitos, leucocitos, granulocitos y células tumorales.

Después de la transfección de una o más células objetivo mediante, por ejemplo, los polinucleótidos encapsulados en una o más nanopartículas lipídicas divulgadas en la presente, la producción del producto (por ejemplo, un polipéptido o proteína) codificado por dicho polinucleótido puede estimularse preferiblemente y se mejora la capacidad de dichas células objetivo para expresar el polinucleótido y producir, por ejemplo, un polipéptido o proteína de interés. Por ejemplo, la transfección de una célula objetivo por una o más nanopartículas lipídicas que encapsulan el 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 de los polinucleótidos a ciertas células o tejidos. Por ejemplo, el hígado representa un órgano objetivo importante para las composiciones divulgadas en la presente debido en parte a su papel central en el metabolismo y la producción de proteínas y, por consiguiente, enfermedades provocadas por defectos en productos génicos específicos del hígado (por ejemplo, los trastornos del ciclo de la urea). puede beneficiarse del direccionamiento específico de células (por ejemplo, hepatocitos). Por consiguiente, las características estructurales del tejido objetivo pueden aprovecharse para dirigir la distribución de las nanopartículas lipídicas (por ejemplo, una nanopartícula lipídica basada en HGT4001) a dichos tejidos objetivo. Por ejemplo, para dirigirse a los hepatocitos, pueden dimensionarse una o más de las nanopartículas lipídicas o modificarse su carga superficial de tal manera que puedan penetrar fácilmente tales fenestraciones endoteliales para alcanzar los hepatocitos objetivo. Alternativamente, puede dimensionarse una nanopartícula lipídica o modificar su carga superficial de tal manera que las dimensiones del liposoma sean de un diámetro suficiente para limitar o evitar expresamente la distribución en ciertas células o tejidos. Por ejemplo, las nanopartículas lipídicas pueden estar dimensionadas de tal manera que sus dimensiones sean mayores que las fenestraciones de la capa endotelial que revisten los sinusoides hepáticos para limitar de este modo la distribución de las nanopartículas lipídicas liposomales a los hepatocitos. En tal realización, las nanopartículas lipídicas grandes no penetrarán fácilmente en las fenestraciones endoteliales, y en su lugar serán depuradas por las células de Kupffer de macrófagos que revisten los sinusoides del hígado. Por tanto, el dimensionamiento de, por ejemplo, las nanopartículas lipídicas puede proporcionar una oportunidad para manipular adicionalmente y controlar con precisión el grado en el que la expresión de los polinucleótidos encapsulados puede potenciarse en una o más células objetivo. Generalmente, el tamaño de por lo menos una de las nanopartículas lipídicas está dentro del intervalo de aproximadamente 25 a 250 nm, preferiblemente menos de aproximadamente 250 nm, 175 nm, 150 nm, 125 nm, 100 nm, 75 nm, 50 nm, 25 nm o 10 nm.

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

En algunas realizaciones, los compuestos lipídicos y las nanopartículas lipídicas descritas en la presente (por ejemplo, nanopartículas lipídicas basadas en HGT4002) se distribuyen a las células y tejidos del hígado para potenciar la administración, la transfección y la expresión posterior de los polinucleótidos (por ejemplo, ARNm) encapsulados en los mismos por las células y tejidos del hígado (por ejemplo, hepatocitos) y la producción correspondiente del polipéptido o proteína codificada por tal polinucleótido. Aunque tales composiciones pueden distribuirse preferencialmente en las células y tejidos del hígado, los efectos terapéuticos de los polinucleótidos expresados y la producción posterior de una proteína codificada por las mismas no necesitan limitarse a las células y tejidos objetivo. Por ejemplo, los hepatocitos objetivo pueden funcionar como un "reservorio" o "depósito" capaz de expresar o producir, y excretar sistémica o periféricamente una proteína o enzima funcional, como se divulga por ejemplo, en la Solicitud Internacional N° PCT/US2010/058457 (WO2011/068810A1) y en la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 61/494.881 (WO 2012/170930 A1). Debe entenderse que las composiciones lipídicas, los vehículos liposomales y los métodos relacionados divulgados en la presente pueden usarse para dirigirse a cualquier célula y/o tejido de tal manera que esas células y/o tejidos objetivo funcionen como un reservorio o depósito capaz de expresar, producir o secretar de otro modo una enzima o proteína funcional. Por ejemplo, las composiciones divulgadas en la presente pueden dirigirse y distribuirse preferencialmente a las células y tejidos del pulmón, corazón, riñones, hígado y/o bazo de tal manera que esas células se vuelvan capaces de expresar (por ejemplo, traducir) la proteína o enzima funcional que está codificada por el polinucleótido (por ejemplo, un polinucleótido de ARNm) encapsulado en los vehículos liposomales (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) divulgadas en la presente. Por consiguiente, la una o más de las nanopartículas lipídicas descritas en la presente (por ejemplo, nanopartículas lipídicas basadas en HGT4005) pueden dirigirse a los hepatocitos y/o distribuirse preferencialmente a las células y tejidos del hígado tras la administración. Después de la transfección de los hepatocitos objetivo por el polinucleótido encapsulado en una o más de tales nanopartículas lipídicas, tales polinucleótidos se expresan (por ejemplo, traducen) y un producto funcional (por ejemplo, un polipéptido o proteína) se excreta y distribuye sistémicamente, donde dicho producto puede ejercer un efecto terapéutico deseado.

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

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

También se contempla la coadministración de uno o más polinucleótidos únicos a células objetivo por los lípidos o nanopartículas lipídicas descritas en la presente, 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 objetivo para tratar un único trastorno o deficiencia, en donde cada uno de dichos polinucleótidos funciona mediante un mecanismo de acción diferente. Por ejemplo, las nanopartículas lipídicas pueden comprender un primer polinucleótido que, por ejemplo, está encapsulado en una nanopartícula lipídica y está destinado a corregir una deficiencia de proteína o enzima endógena, y un segundo polinucleótido destinado a desactivar o "derribar" un polinucleótido endógeno que funciona mal y su proteína o producto enzimático. Tales polinucleótidos encapsulados pueden codificar, por ejemplo, ARNm o ARNip.

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

Como se usa en la presente, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), incluyendo pero no limitado a, humanos, primates no humanos, roedores y similares, a los que se pueden administrar los lípidos, compuestos o nanopartículas lipídicas divulgados en la presente. Típicamente, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en la presente en referencia a un sujeto humano.

La capacidad de los lípidos, compuestos y/o nanopartículas lipídicas descritos en la presente para modular o potenciar la expresión de polinucleótidos encapsulados y la producción de un polipéptido o proteína proporciona un medio novedoso y más eficaz de efectuar la producción *in vivo* de polipéptidos y proteínas para el tratamiento de una serie de enfermedades o afecciones patológicas. Tales composiciones de nanopartículas lipídicas son particularmente adecuadas para el tratamiento de enfermedades o afecciones patológicas asociadas con la expresión aberrante de ácidos nucleicos que codifican una proteína o enzima. Por ejemplo, la administración con éxito de polinucleótidos como el ARNm a órganos objetivo como el hígado y, en particular, a los hepatocitos, puede usarse para el tratamiento y la corrección de errores innatos del metabolismo que están localizados en el hígado. Por consiguiente, los lípidos, compuestos, nanopartículas lipídicas y métodos relacionados descritos en la presente pueden emplearse para tratar una amplia variedad de enfermedades y afecciones patológicas, en particular aquellas enfermedades que se deben a deficiencias de proteínas o enzimas. Los polinucleótidos encapsulados por los lípidos o nanopartículas lipídicas descritos en la presente (por ejemplo, nanopartícula lipídica basada en HGT4004) pueden codificar un producto funcional (por ejemplo, una proteína, enzima, polipéptido, péptido, ARN funcional, y/o molécula antisentido), y preferiblemente codifican un producto del que se desea la producción *in vivo*.

Los lípidos y nanopartículas lipídicas divulgados en la presente son ampliamente aplicables a la administración de agentes terapéuticos como polinucleótidos, y en particular ARNm, para tratar una serie de trastornos. En particular, tales compuestos y composiciones son adecuados para el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con la deficiencia de proteínas y/o enzimas. En ciertas realizaciones, los polinucleótidos encapsulados en nanopartículas lipídicas codifican proteínas o enzimas funcionales que son excretadas o secretadas por una o más células objetivo en el fluido extracelular circundante (por ejemplo, ARNm que codifica hormonas y neurotransmisores). Alternativamente, en otra realización, los polinucleótidos encapsulados por los lípidos y/o nanopartículas lipídicas codifican proteínas o enzimas funcionales que permanecen en el citosol de una o más células objetivo (por ejemplo, ARNm que codifica una enzima asociada con el ciclo de la urea o trastornos

metabólicos por almacenamiento lisosomal). Otros trastornos para los que los lípidos, compuestos y nanopartículas lipídicas son útiles incluyen, pero no se limitan a, trastornos como atrofia muscular espinal (AME) relacionada con SMN1; esclerosis lateral amiotrófica (ELA); galactosemia relacionada con GALT; fibrosis quística (FQ); trastornos relacionados con SLC3A1 incluyendo cistinuria; trastornos relacionados con COL4A5 incluyendo el síndrome de Alport; deficiencias de galactocerebrosidasa; adrenoleucodistrofia ligada a X y adrenomieloneuropatía; ataxia de Friedreich; enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher; esclerosis tuberosa relacionada con TSC1 y TSC2; síndrome de Sanfilippo B (MPS IIIB); cistinosis relacionada con CTNS; los trastornos relacionados con FMR1 que incluyen el síndrome del X frágil, el síndrome de temblor/ataxia asociado a X frágil y el síndrome de insuficiencia ovárica prematura del X frágil; síndrome de Prader-Willi; enfermedad de Fabry; telangiectasia hemorrágica hereditaria (AT); enfermedad de Niemann-Pick tipo C1; las enfermedades relacionadas con las lipofuscinoses ceroides neuronales que incluyen la lipofuscinosis neuroide neuronal juvenil (JNCL), la enfermedad de Batten juvenil, la enfermedad de Santavuori-Haltia, la enfermedad de Jansky-Bielschowsky y las deficiencias de PTT-1 y TPP1; ataxia infantil relacionada con EIF2B1, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B4 y EIF2B5 con hipomielinización del sistema nervioso central/desaparición de sustancia blanca; ataxia episódica tipo 2 relacionada con CACNA1A y CACNB4; los trastornos relacionados con MECP2 que incluyen el síndrome de Rett clásico, la encefalopatía neonatal grave relacionada con MECP2 y el síndrome PPM-X; síndrome de Rett atípico relacionado con CDKL5; enfermedad de Kennedy (SBMA); arteriopatía cerebral autosómica dominante relacionada con Notch-3 con infartos subcorticales y leucoencefalopatía (CADASIL); trastornos convulsivos relacionados con SCN1A y SCN1B; los trastornos relacionados con la polimerasa G que incluyen síndrome de Alpers-Huttenlocher, neuropatía atáxica sensorial relacionada con POLG, disartria y oftalmoparesia, y oftalmoplejía externa progresiva autosómica dominante y recesiva con deleciones de ADN mitocondrial; hipoplasia suprarrenal ligada a X; Agammaglobulinemia ligada a X; y enfermedad de Wilson. En ciertas realizaciones, los polinucleótidos, y en particular el ARNm, pueden codificar proteínas o enzimas funcionales. Por ejemplo, las composiciones pueden incluir ARNm que codifica ornitina transcarbamilasa (OTC), carbamoil-fosfato sintetasa 1 (CPS1), argininosuccinato sintetasa (ASS1), argininosuccinato liasa (ASL) o arginasa 1 (ARG1), regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), alfa glucosidasa ácida, arilsulfatasa A, alfa galactosidasa A, eritropoyetina, α 1-antitripsina, carboxipeptidasa N, alfa-L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, iduronato sulfatasa, N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa, N-acetilglucosaminidasa, alfa-glucosaminidasa acetiltransferasa, N-acetilglucosamina 6-transferasa, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, beta-glucosidasa, galactosa-6-sulfato sulfatasa, beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa, glucocerebrosidasa, heparán sulfamidasa, heparina-N-sulfatasa, lipasa ácida lisosomal, hialuronidasa, galactocerebrosidasa, hormona del crecimiento humano, neurona motora de supervivencia, factor VIII, factor IX o receptores de lipoproteínas de baja densidad.

En una realización, el ARNm codifica una proteína o una enzima seleccionada del grupo que consiste de hormona de crecimiento humana, eritropoyetina, α 1-antitripsina, alfa glucosidasa ácida, arilsulfatasa A, carboxipeptidasa N, α -galactosidasa A, alfa-L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, iduronato sulfatasa, N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa, N-acetilglucosaminidasa, alfa-glucosaminidasa acetiltransferasa, N-acetilglucosamina 6-sulfatasa, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, beta-glucosidasa, galactosa-6-sulfato sulfatasa, beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa, glucocerebrosidasa, heparán sulfamidasa, heparina-N-sulfatasa, lipasa ácida lisosomal, hialuronidasa, galactocerebrosidasa, ornitina transcarbamilasa (OTC), carbamoil-fosfato sintetasa 1 (CPS1), argininosuccinato sintetasa (ASS1), argininosuccinato liasa (ASL), arginasa 1 (ARG1), regulador de la conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR), neurona motora de supervivencia (SMN), factor VIII, factor IX y receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR).

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

Los lípidos y nanopartículas lipídicas pueden administrarse y dosificarse de acuerdo con la práctica médica actual, teniendo en cuenta la condición clínica del sujeto, la naturaleza de los materiales encapsulados, el sitio y método de administración, la programación de administración, la edad, sexo, peso corporal y otros factores relevantes del sujeto para los médicos expertos en la técnica. La "cantidad eficaz" para los propósitos de la presente puede determinarse mediante consideraciones relevantes conocidas por los expertos en la investigación clínica experimental, las técnicas farmacológica, clínica y médica. En algunas realizaciones, la cantidad administrada es eficaz para lograr por lo menos cierta estabilización, mejora o eliminación de los síntomas y otros indicadores que se seleccionan como medidas apropiadas del progreso, regresión o mejora de la enfermedad por parte de los expertos en la técnica. Por ejemplo, una cantidad adecuada y un régimen de dosificación es uno que provoca por lo menos una expresión transitoria de uno o más polinucleótidos en las células objetivo.

Las vías de administración adecuadas de los lípidos, compuestos y nanopartículas lipídicas divulgados en la presente incluyen, por ejemplo, administración oral, rectal, vaginal, transmucosal o intestinal; administración parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas, intramedulares, así como inyecciones o infusiones intratecales, intracerebroventriculares, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o

intraoculares. En ciertas realizaciones, la administración de la nanopartícula lipídica descrita en la presente a un sujeto facilita el contacto de tales composiciones con una o más células, tejidos u órganos objetivo.

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

Los lípidos y las nanopartículas lipídicas (nanopartículas lipídicas que se han neutralizado de acuerdo con las enseñanzas proporcionadas en la presente) son preferiblemente estables (por ejemplo, cuando se almacenan en condiciones refrigeradas durante por lo menos un año). En ciertas realizaciones, la estabilidad de los lípidos y las nanopartículas lipídicas proporcionadas en la presente puede ampliarse liofilizando tales composiciones. Por consiguiente, también se contemplan en la presente nanopartículas lipídicas liofilizadas que comprenden uno o más de los compuestos lipídicos divulgados en la presente y métodos relacionados para el uso de tales composiciones liofilizadas como se divulga por ejemplo, en la Solicitud Provisional de Estados Unidos Nº 61/494.882 (WO 2012/170889 A1), presentada el 8 de junio de 2011.

En ciertas realizaciones, las composiciones se formulan de tal manera que son adecuadas para la liberación prolongada de, por ejemplo, polinucleótidos o ácidos nucleicos encapsulados en las mismas. Tales composiciones de liberación prolongada pueden administrarse convenientemente a un sujeto a intervalos de dosificación prolongados. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las composiciones se administran a un sujeto dos veces al día, diariamente o cada dos días. En ciertas realizaciones, las composiciones se administran a un sujeto dos veces a la semana, una vez a la semana, cada diez días, cada dos semanas, cada tres semanas, o más preferiblemente cada cuatro semanas, una vez al mes, cada seis semanas, cada ocho semanas, cada dos meses, cada tres meses, cada cuatro meses, cada seis meses, cada ocho meses, cada nueve meses o anualmente. También se contemplan composiciones y nanopartículas lipídicas que se formulan para la administración de depósito (por ejemplo, por vía intramuscular, subcutánea, intravítrea) para administrar o liberar un polinucleótido (por ejemplo, ARNm) durante períodos de tiempo prolongados. Preferiblemente, los medios de liberación prolongada empleados se combinan con modificaciones (por ejemplo, modificaciones químicas) introducidas en los polinucleótidos para mejorar la estabilidad.

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

Debe entenderse que los artículos "un" y "uno" como se usan en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones, a menos que se indique claramente lo contrario, incluyen los referentes plurales. Debe entenderse que, en general, cuando se hace referencia a que la invención, o aspectos de la invención, comprende elementos, características, etc. particulares, ciertas realizaciones o aspectos de la invención consisten, o consisten esencialmente de, tales elementos, características, etc. Con propósitos de simplicidad, esas realizaciones no se han expuesto específicamente explícitamente en la presente.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

El presente ejemplo ilustra que las nanopartículas lipídicas basadas en HGT4002 pueden neutralizarse reductivamente después de haber sido cargadas con constructos de polinucleótidos de ARNm. Las nanopartículas lipídicas basadas en HGT4002 se formaron mediante métodos estándar de inyección de etanol como se describe a continuación. (Ponsa, et al., Int. J. Pharm. (1993) 95: 51-56.) Se prepararon soluciones madre etanólicas de los lípidos por anticipado a una concentración de 50 mg/ml y se almacenaron a -20°C.

Se sintetizó ARNm de luciferasa de luciérnaga optimizado con codón (CO-FFL) mediante transcripción *in vitro* a partir de una plantilla de ADN plasmídico, que fue seguido por la adición de una estructura de tapa 5' (Cap1) (Fechter, P. et al., J. Gen Virology (2005) 86: 1239-1249) y una cola de poli (A) 3' de aproximadamente 200

nucleótidos de longitud determinada por electroforesis en gel. Las regiones no traducidas 5' y 3' presentes en cada producto de ARNm se representan como X e Y, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, como se indica a continuación.

5 *ARNm de luciferasa de luciérnaga (FFL) optimizado con codón: SEQ ID NO: 1*

10 **X**AUGGAAGAUGCCAAAAACAUAAGAAGGGCCAGCGCCAUUCUACCCACUCGAAGACGGGA
 CCGCCGGCGAGCAGCUGCACAAAGCCAUGAAGCGCUACGCCUGGUGCCCGGCACCAUCGCC
 15 UUUACCGACGCACAUAUCGAGGUGGACAUUACCUACGCCGAGUACUUCGAGAUGAGCGUUCG
 GCUGGCAGAAAGCUAUGAAGCGCUAUGGGCUGAAUACAAACCAUCGGAUCGUGGUGUGCAGCG
 AGAAUAGCUUGCAGUUCUUAUGCCCGUGUUGGGUGCCCGUUCUACGUGUGGUGUGGCC
 CCAGCUAACGACAUCUACAACGAGCGCGAGCUGCUGAACAGCAUGGGCAUCAGCCAGCCAC
 20 CGUCGUAUUCGUGAGCAAGAAAGGGCUGCAAAAGAUCUCAACGUGCAAAAGAAGCUACCGA
 UCAUACAAAAGAUCAUCAUGGAUAGCAAGACCGACUACCAGGGCUUCCAAAGCAUGUAC
 ACCUUCGUGACUUCUCCAUUUGCCACCCGGCUUCAACGAGUACGACUUCGUGCCCGAGAGCUU
 CGACCGGGACAAAACCAUCGCCCGUGAUCAUGAACAGUAGUGGCAGUACCGGAUUGCCCAAGG
 25 GCGUAGCCCUACCGCACCGCACCGCUUGUGUCCGAUUCAGUCAUGCCCGCGACCCCAUCUUC
 GGCAACCAGAUCAUCCCGACACCGCUAUCCUCAGCGUGGUGCCAUUUCACCACGGCUUCGG
 CAUGUUCACCACGCUUGGGCUACUUGAUCUGCGGCUUUCGGGUCGUGCUCAUGUACCGCUUCG
 AGGAGGAGCUAUUCUUGCGCAGCUUGCAAGACUAUAAGAUAUCAAUCUGCCCGUGGUGCCC
 30 ACACUAUUUAGCUUCUUCGCUAAGAGCACUCUCAUCGACAAGUACGACCUAAGCAACUUGCA
 CGAGAUCCGCGCGGGCGCCGCUAGCAAGGAGGUAGGUGAGGCCGUGGCCAAACGCU
 UCCACCUACCAGGCAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACAGAAACAACCAGCGCCAUUCUGAUC
 35 ACCCCCGAAGGGGACGACAAGCCUGGCGCAGUAGGCAAGGUGGCCUUCUUCGAGGCUAA
 GGUGGUGGACUUGGACACCGGUAAGACACUGGGUGUGAACCAGCGCGGCGAGCUGUGCGUCC
 GUGGCCCAUGAUCAUGAGCGGCUACGUUAAACAACCCGAGGCUACAAACGCUCUCAUCGAC
 AAGGACGGCUGGUGCAGCGGGCAGCAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUCAU
 40 CGUGGACCGGCUGAAGAGCCUGAUCAAAUACAAGGGCUACCAGGUAGCCCCAGCCGAACUGG
 AGAGCAUCCUGCUGCAACACCCCAACAUCUUCGACGCCGGGGUCGCCGGCCUGCCCGACGAC
 GAUGCCGGCGAGCUGCCCGCCGAGUCGUCGUGCUGGAACACGGUAAAACCAUGACCGAGAA
 GGAGAUCGUGGACUAUGUGGCCAGCCAGGUUACAACCGCCAAGAAGCUGCGCGGUGGUGUUG
 45 UGUUCGUGGACGAGGUGCCUAAAGGACUGACCGGCAAGUUGGACGCCCGCAAGAUCGCGGAG
 AUUCUCAUUAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCGCCGUGUAY

X = GGAUCCUACC (SEQ ID NO: 2)

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

50 Luego, se desnaturalizaron 0,25 mg del ARNm de FFL calentándolos a 70° C durante 5 minutos usando un
 bloque de calor. Se preparó un volumen de 3 ml de una solución acuosa tamponada (citrato 10 mM/NaCl 150 mM,
 pH 4,5) y se calentó en un tubo cónico libre de ARNasa de 15 ml colocando el tubo en un baño de agua caliente, y
 dentro del cual se siguió con la adición instantánea del ARNm de FFL en la solución tamponada acuosa calentada
 para lograr una concentración final de ARNm de FFL de 0,25 mg/3 ml.

55 Todas las concentraciones de ARNm se determinaron mediante el ensayo Ribogreen (Invitrogen). La
 encapsulación del ARNm se calculó realizando el ensayo Ribogreen con y sin la presencia de Triton-X 100 al 0,1%.
 Los tamaños de partículas (dispersión dinámica de luz (DLS)) y los potenciales zeta se determinaron usando un
 instrumento Malvern Zetasizer en soluciones 1x PBS y KCl 1 mM, respectivamente.

60 Para preparar las nanopartículas lipídicas, se mezclaron alícuotas de 50 mg/ml de soluciones etanólicas de
 HGT4002, DOPE, colesterol y DMG-PEG2000 como se indica a continuación en la Tabla 1, se calentaron para
 asegurar la disolución y se diluyeron con etanol. La solución de lípidos resultante es adecuada para 0,25 mg de
 ARNm con una relación N/P de 4.

65

Tabla 1

Componentes Lipídicos	Relación Molar	MW	μmol	Peso (mg)	Volumen (μL)
DMG-PEG2000	6	2509.19	1.04	2.6	52.2
HGT4002	18	506	3.12	1.6	31.6
CHOL	20	386.65	3.47	1.3	26.8
DOPE	56	744.03	9.71	7.2	144.4
<i>Total</i>	<i>100</i>	<i>--</i>	<i>17.33</i>	<i>12.8</i>	<i>255.0</i>

Se inyectaron rápidamente 0,5 ml de la solución lipídica etanólica en la solución ARNm/tampón acuosa calentada (70° C), se agitó y la suspensión resultante se devolvió rápidamente al baño de agua a 70° C. La suspensión de nanopartículas resultante se concentró, se volvió a suspender en un tampón de borato de sodio (pH 8,0), se pasó a través de membranas MUSTANG Q (Pall Life Sciences), se filtró y se diafiltró con 1x PBS (pH 7,4) y se concentró adicionalmente. La Z_{ave} de las nanopartículas de lípidos resultantes fue de 159,4 nm ($Dv_{(50)} = 147$ nm; $Dv_{(90)} = 299$ nm) y el potencial Zeta medio fue de 28,0 mV. Las nanopartículas lipídicas demostraron una eficiencia de encapsulación de aproximadamente el 82%.

Luego, las nanopartículas lipídicas se expusieron a soluciones acuosas que comprendían el agente reductor β-mercaptoetanol (β-ME) y se evaluó el potencial Zeta de la nanopartícula lipídica. La exposición de las nanopartículas lipídicas a 250 μl (100X) de una solución de β-ME durante una hora provocó que el potencial Zeta de la nanopartícula lipídica se redujera a 15,8 mV. La exposición de las nanopartículas lipídicas a 250 μl (100X) de una solución de β-ME durante tres horas hizo que el potencial Zeta de la nanopartícula lipídica se redujera a -0,26 mV. La exposición de las nanopartículas lipídicas a 25 μl (10X) de una solución de β-ME durante veintidós horas hizo que el potencial Zeta de la nanopartícula lipídica se redujera a 1,59 mV.

Lo anterior apoya la conclusión de que tras la exposición a un agente reductor, la carga (es decir, el potencial Zeta) de las nanopartículas lipídicas basadas en HGT4002 puede modularse y, en ciertos casos, neutralizarse.

Ejemplo 2

El presente ejemplo ilustra que las nanopartículas lipídicas basadas en HGT4002 pueden neutralizarse reductivamente después de haber sido cargadas con constructos de polinucleótidos de ARNm. Las nanopartículas lipídicas basadas en HGT4002 se formaron mediante métodos estándar de inyección de etanol como se describe a continuación. (Ponsa, et al., Int. J. Pharm. (1993) 95: 51-56.) Se prepararon soluciones madre etanólicas de los lípidos por anticipado a una concentración de 50 mg/ml y se almacenaron a -20° C.

Se sintetizó ARNm de luciferasa de luciérnaga optimizado con codón (CO-FFL) mediante transcripción *in vitro* a partir de una plantilla de ADN plasmídico, que fue seguido por la adición de una estructura de tapa 5' (Cap1) (Fechter, P. et al., J. Gen Virology (2005) 86: 1239-1249) y una cola de poli(A) 3' de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud según se determinó por electroforesis en gel. Las regiones no traducidas 5' y 3' presentes en cada producto de ARNm se representan como X e Y, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, como se indica a continuación.

ARNm de luciferasa de luciérnaga (FFL) optimizado con codón: SEC ID NO: 1

XAUGGAAGAUGCCAAAAACAUAAGAAGGGCCAGCGCCAUUCUACCCACUCGAAGACGGGA
 CCGCCGGCGAGCAGCUGCACAAAGCCAUGAAGCGCUACGCCUGGUGCCCGGCACCAUCGCC
 UUUACCGACGCACAUAUCGAGGUGGACAUUACCUACGCCGAGUACUUCGAGAUGAGCGUUCG
 5 GCUGGCAGAAGCUAUGAAGCGCUAUGGGCUGAAUACAAACCAUCGGAUCGUGGUGUGCAGCG
 AGAAUAGCUUGCAGUUCUUAUGCCCGUGUUGGGUGCCCUGUUAUCGGUGUGGCUGUGGCC
 CCAGCUAACGACAUCUACAACGAGCGCGAGCUGCUGAACAGCAUGGGGCAUCAGCCAGCCAC
 CGUCGUAAUUCGUGAGCAAGAAAGGGCUGCAAAAGAUAUCUACGUGCAAAAGAAGCUACCGA
 10 UCAUACAAAAGAUAUCAUCAUGGAUAGCAAGACCGACUACCAGGGCUUCCAAAGCAUGUAC
 ACCUUCGUGACUUCUCCAUUUGCCACCCGGCUUACAAGAGUACGACUUCGUGCCCAGAGCUU
 CGACCGGGACAAAACCAUCGCCCGUAUCAUGAACAGUAGUGGCAGUACCGGAUUGCCCAAGG
 GCGUAGCCCUACCGCACCGCACCGCUUGUGUCCGAUUCAGUCAUGCCCGCGACCCCAUCUUC
 15 GGCAACCAGAUAUCCCCGACACCGCUAUCCUCAGCGUGGUGCCAUUUCACCACGGCUUCGG
 CAUGUUCACCACGCUGGGCUACUUGAUCUGCGGCUUUCGGGUCGUGCUCAUGUACCGCUUCG
 AGGAGGAGCUAUUCUUGCGCAGCUUGCAAGACUAUAAGAUUCAAUCUGCCCUGCUGGUGCCC
 ACACUAUUUAGCUUCUUCGCUAAGAGCACUCUCAUCGACAAGUACGACCUAAGCAACUUGCA
 20 CGAGAUCGCCAGCGGGCGGGCGCCGCUAGCAAGGAGGUAGGUGAGGCCGUGGCCAAACGCU
 UCCACCUACCAGGCAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACAGAAACAACCAGCGCCAUUCUGAUC
 ACCCCCGAAGGGGACGACAAGCCUGGCGCAGUAGGCAAGGUGGUGCCCUUCUUCGAGGCUAA
 GGUGGUGGACUUGGACACCGGUAAGACACUGGGUGUGAACAGCGCGGCGAGCUGUGCGUCC
 25 GUGGCCCAUGAUAUGAGCGGCUACGUUAAACAACCCGAGGCUACAAACGCUCUCAUCGAC
 AAGGACGGCUGGUGCAGCGGGCGACAUCGCCUACUGGGGACGAGGACGAGCACUUCUUAU
 CGUGGACCGGCUGAAGAGCCUGAUCAAAUACAAGGGCUACCAGGUAGCCCCAGCCGAACUGG
 AGAGCAUCCUGCUGCAACACCCCAACAUCUUCGACGCCGGGUGCGCGGCCUGCCCGACGAC
 30 GAUGCCGGCGAGCUGCCCGCCGACGUCGUCGUGGGAACACGGUAAAACCAUGACCGAGAA
 GGAGAUCGUGGACUAUGUGGCCAGCCAGGUUACAACCGCCAAGAAGCUGCGCGGUGGUGUUG
 UGUUCGUGGACGAGGUGCCUAAAGGACUGACCGGCAAGUUGGACGCCCGCAAGAUCGCGGAG
 35 AUUCUCAUUAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCGCCGUGUA**Y**

X = GGAUCCUACC (SEQ ID NO: 2)

Y = UUUGAAUU (SEQ ID NO: 3)

40 Luego, se desnaturalizaron 0,25 mg del ARNm de FFL calentándolos a 70° C durante 5 minutos usando un
 bloque de calor. Se preparó un volumen de 2 ml de una solución acuosa tamponada (citrate 10 mM/NaCl 150 mM,
 pH 4,5) y se calentó en un tubo cónico libre de RNasa colocando el tubo en un baño de agua caliente, y dentro del
 cual se siguió con la adición instantánea del ARNm de FFL en la solución tamponada acuosa calentada para lograr
 una concentración final de ARNm de FFL de 0,25 mg/2 ml.

45 Todas las concentraciones de ARNm se determinaron mediante el ensayo Ribogreen (Invitrogen). La
 encapsulación del ARNm se calculó realizando el ensayo Ribogreen con y sin la presencia de Triton-X 100 al 0,1%.
 Los tamaños de partículas (dispersión dinámica de luz (DLS)) y los potenciales zeta se determinaron usando un
 instrumento Malvern Zetasizer en soluciones 1x PBS y KCl 1 mM, respectivamente.

50 Para preparar las nanopartículas lipídicas, se mezclaron alícuotas de 50 mg/ml de soluciones etanólicas de
 HGT4002, DOPE, colesterol y DMG-PEG2000 como se indica en la Tabla 2 a continuación, se calentaron para
 asegurar la disolución y se diluyeron con etanol. La solución de lípidos resultante es adecuada para 0,25 mg de
 ARNm con una relación N/P de 4.

Tabla 2

Componentes Lipídicos	Relación Molar	MW	μmol	Peso (mg)	Volumen (μL)
DMG-PEG2000	6	2509.19	1.04	2.6	52.2
HGT4002	18	506	3.12	1.6	31.6
CHOL	20	386.65	3.47	1.3	26.8
DOPE	56	744.03	9.71	7.2	144.4
Total	100	--	17.33	12.8	255.0

Se inyectaron rápidamente 0,5 ml de la solución de lípidos etanólica en la solución ARNm/tampón acuosa calentada (70° C), se agitó y la suspensión resultante se devolvió rápidamente al baño de agua a 70° C. La suspensión de nanopartículas resultante se concentró, se volvió a suspender en un tampón de borato de sodio (pH 8,0), se pasó a través de membranas MUSTANG Q (Pall Life Sciences), se filtró y se diafiltró con 1x PBS (pH 7,4) y se concentró adicionalmente. La Z_{ave} de las nanopartículas lipídicas resultantes fue de 115,5 nm ($Dv_{(50)} = 92,1$ nm; $Dv_{(90)} = 162$ nm) y el potencial Zeta medio fue de 29,1 mV. Las nanopartículas lipídicas demostraron una eficiencia de encapsulación de aproximadamente el 80%.

Las nanopartículas lipídicas se expusieron luego a soluciones acuosas que comprendían el agente reductor β-mercaptoetanol (β-ME) y se evaluó el potencial Zeta de la nanopartícula lipídica. La exposición de las nanopartículas lipídicas a 25 μl (10X) de una solución de β-ME durante dieciocho horas hizo que el potencial Zeta de la nanopartícula lipídica se redujera a -3,50 mV. La exposición de las nanopartículas lipídicas a 250 μl (100X) de una solución de β-ME durante una hora hizo que el potencial Zeta de la nanopartícula lipídica se redujera a 14,8 mV. La exposición de las nanopartículas lipídicas a 250 μl (100X) de una solución de β-ME durante dos horas y media hizo que el potencial Zeta de la nanopartícula lipídica se redujera a 2,85 mV. La exposición de las nanopartículas lipídicas a 250 μl (100X) de una solución de β-ME durante tres horas hizo que el potencial Zeta de la nanopartícula lipídica se redujera a -3,40 mV.

Ejemplo 3

El presente ejemplo ilustra además que las nanopartículas lipídicas basadas en HGT4002 pueden neutralizarse reductivamente después de haber sido cargadas con constructos de polinucleótidos de ARNm. Las nanopartículas lipídicas basadas en HGT4002 se formaron mediante métodos estándar de inyección de etanol como se describe a continuación. (Ponsa, et al., Int. J. Pharm. (1993) 95: 51-56.) Se prepararon soluciones madre etanólicas de los lípidos por anticipado a una concentración de 50 mg/ml y se almacenaron a -20° C.

Se sintetizó ARNm de luciferasa de luciérnaga optimizado con codón (CO-FFL) mediante transcripción *in vitro* a partir de una plantilla de ADN plasmídico, que fue seguido por la adición de una estructura de tapa 5' (Cap1) (Fechter, P. et al., J. Gen Virology (2005) 86: 1239-1249) y una cola de poli(A) 3' de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud según se determinó por electroforesis en gel. Las regiones no traducidas 5' y 3' presentes en cada producto de ARNm se representan como X e Y, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, como se indica a continuación.

ARNm de luciferasa de luciérnaga (FFL) optimizado con codón: **SEQ ID NO: 1**

XAUGGAAGAUGCCAAAAACAUAAGAAGGGCCCAGCGCCAUUCUACCCACUCGAAGACGGGA
 CCGCCGGCGAGCAGCUGCACAAAGCCAUGAAGCGCUACGCCUGGUGCCCGGCCACCAUCGCC
 UUUACCGACGCACAUAUCGAGGUGGACAUUACCUACGCCGAGUACUUCGAGAUGAGCGUUCG
 GCUGGCAGAAGCUAUGAAGCGCUAUGGGCUGAAUACAAACCAUCGGAUCGUGGUGUGCAGCG
 AGAAUAGCUUGCAGUUCUUAUGCCCGUGUUGGGUGCCCUGUUAUCGGUGUGGCUGUGGCC
 CCAGCUAACGACAUCUACAACGAGCGCGAGCUGCUGAACAGCAUGGGGCAUCAGCCAGCCCAC
 CGUCGUAUUCGUGAGCAAGAAAGGGCUGCAAAGAUAUCCUCAACGUGCAAAAGAAGCUACCGA
 UCAUACAAAAGAUCAUCAUGGAUAGCAAGACCGACUACCAGGGCUUCCAAAGCAUGUAC
 ACCUUCGUGACUUCUCCAUUUGCCACCCGGCUUCAACGAGUACGACUUCGUGCCCGAGAGCUU
 CGACCGGGACAAAACCAUCGCCUGAUGAACAGUAGUGGCAGUACCGGAUUGCCCAAGG
 GCGUAGCCCUACCGCACCGCACCGCUUGUGUCCGAUUCAGUCAUGCCCGCGACCCCAUCUUC

GGCAACCAGAUCAUCCCCGACACCGCUAUCCUCAGCGUGGUGCCAUUUACCCACGGCUUCGG
 CAUGUUCACCACGCUGGGCUACUUGAUCUGCGGCUUUCGGGUCGUGCUCAUGUACCGCUUCG
 AGGAGGAGCUAUUCUUGCGCAGCUUGCAAGACUAUAAGAUAUCAAUCUGCCCUGCUGGUGCCC
 5 ACACUAUUUAGCUUCUUCGCUAAGAGCACUCUCAUCGACAAGUACGACCUAAGCAACUUGCA
 CGAGAUCGCCAGCGGGCGGGCGCCGCUAGCAAGGAGGUAGGUGAGGCCGUGGCCAAACGCU
 UCCACCUACCAGGCAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACAGAAACAACCAGCGCCAUUCUGAUC
 ACCCCCCGAAGGGGACGACAAGCCUGGCGCAGUAGGCAAGGUGGUGCCCUUCUUCGAGGCUAA
 10 GGUGGUGGACUUGGACACCGGUAAGACACUGGGUGUGAACCAGCGCGGGCAGCUGUGCGUCC
 GUGGCCCCCAUGAUCUAGAGCGGCUACGUUAAACAACCCCGAGGCUACAAACGCUCUCAUCGAC
 AAGGACGGCUGGUGCAGCGGGCGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUCU
 CGUGGACCGGCUAAGAGCCUGAUCAAUACAAGGGCUACCAGGUAGCCCCAGCCGAACUGG
 15 AGAGCAUCCUGCUGCAACACCCCAACAUCUUCGACGCCGGGGUGCGCGGCCUGCCCGACGAC
 GAUGCCGGCGAGCUGCCCGCCGAGUCGUCGUGCUGGAACACGGUAAAACCAUGACCGAGAA
 GGAGAUCGUGGACUAUGUGGCCAGCCAGGUUACAACCGCCAAGAAGCUGCGCGGUGGUGUUG
 UGUUCGUGGACGAGGUGCCUAAAGGACUGACCGGCAAGUUGGACGCCCCGAAGAUCGCGGAG
 20 AUUCUCAUUAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCGCCGUGUA^Y

X = GGGAUCCUACC (SEQ ID NO: 2)

Y = UUUGAAUU (SEQ ID NO: 3)

25 Luego, se desnaturalizaron 0,25 mg del ARNm de FFL calentándolos a 70° C durante 5 minutos usando un
 bloque de calor. Se preparó un volumen de 3 ml de una solución acuosa tamponada (citrate 10 mM/NaCl 150 mM,
 pH 4,5) y se calentó en un tubo cónico libre de ARNasa colocando el tubo en un baño de agua caliente, y dentro del
 cual se siguió con la adición instantánea del ARNm de FFL en la solución tamponada acuosa calentada para lograr
 una concentración final de ARNm de FFL de 0,25 mg/3 ml.

30 Todas las concentraciones de ARNm se determinaron mediante el ensayo Ribogreen (Invitrogen). La
 encapsulación del ARNm se calculó realizando el ensayo Ribogreen con y sin la presencia de Triton-X 100 al 0,1%.
 Los tamaños de partículas (dispersión dinámica de luz (DLS)) y los potenciales zeta se determinaron usando un
 instrumento Malvern Zetasizer en soluciones 1x PBS y KCl 1 mM, respectivamente.

35 Para preparar las nanopartículas lipídicas, se mezclaron alícuotas de 50 mg/ml de soluciones etanólicas de
 HGT4002, DOPE, colesterol y DMG-PEG2000 como se indica en la Tabla 3 a continuación, se calentaron para
 asegurar la disolución y se diluyeron con etanol. La solución de lípidos resultante es adecuada para 0,25 mg de
 ARNm con una relación N/P de 4.

Tabla 3

Componentes Lipídicos	Relación Molar	MW	μmol	Peso (mg)	Volumen (μL)
DMG-PEG2000	6	2509.19	1.04	2.6	52.2
HGT4002	18	506	3.12	1.6	31.6
CHOL	20	386.65	3.47	1.3	26.8
DOPE	56	744.03	9.71	7.2	144.4
Total	100	--	17.33	12.8	255.0

40 Se inyectaron rápidamente 0,5 ml de la solución de lípidos etanólica en la solución ARNm/tampón acuosa
 calentada (70° C), se agitó y la suspensión resultante se devolvió rápidamente al baño de agua a 70° C. La
 45 suspensión de nanopartículas resultante se concentró, se volvió a suspender en un tampón de borato de sodio (pH
 8,0), se pasó a través de membranas MUSTANG Q (Pall Life Sciences), se filtró y se diafiltró con 1x PBS (pH 7,4) y
 se concentró adicionalmente. El potencial Zeta medio de las nanopartículas lipídicas resultantes fue de 25,7 mV.

50 Se preparó una solución madre 0,1 M que comprendía el agente reductor *tris*(2-carboxietil)fosfina (TCEP)
 60 disolviendo 28,7 mg de TCEP en 1 ml de agua. Las nanopartículas lipídicas se expusieron luego a soluciones
 acuosas que comprendían el TCEP y se evaluó el potencial Zeta de la nanopartícula lipídica. La exposición de las
 nanopartículas lipídicas a 19,5 μl (5X) de una solución de TCEP durante cinco minutos hizo que el potencial Zeta de
 la nanopartícula lipídica aumentara a 26,1 mV. La exposición de las nanopartículas lipídicas a 19,5 μl (5X) de una
 65 solución de TCEP durante dos horas hizo que el potencial Zeta de la nanopartícula lipídica se redujera a 14,5 mV. La
 exposición de las nanopartículas lipídicas a 19,5 μl (5X) de una solución de TCEP durante cuatro horas hizo que el

potencial Zeta de la nanopartícula lipídica se redujera a 5,65 mV. Es probable que la concentración de la solución de TCEP y la duración de la exposición contribuyesen a los cambios observados en el potencial Zeta observado en un periodo de tiempo relativamente corto.

Lo anterior apoya la conclusión de que tras la exposición a un agente reductor, la carga (es decir, el potencial Zeta) de las nanopartículas lipídicas basadas en HGT4002 puede modularse y, en ciertos casos, neutralizarse.

Ejemplo 4

El presente ejemplo ilustra que las nanopartículas lipídicas basadas en HGT4002 pueden neutralizarse reductivamente después de haber sido cargadas con constructos de polinucleótidos de ARNm. Las nanopartículas lipídicas basadas en HGT4002 se formaron mediante métodos estándar de inyección de etanol como se describe a continuación. (Ponsa, et al., Int. J. Pharm. (1993) 95: 51-56.) Se prepararon soluciones madre etanólicas de los lípidos por anticipado a una concentración de 50 mg/ml y se almacenaron a -20° C.

Se sintetizó ARNm de luciferasa de luciérnaga optimizado con codón (CO-FFL) mediante transcripción *in vitro* a partir de una plantilla de ADN plasmídico que codifica el gen, que fue seguida por la adición de una estructura de capa 5' (Cap1) (Fechter, P. et al., J. Gen. Virology (2005) 86: 1239-1249) y una cola de poli(A) 3' de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud como se determinó por electroforesis en gel. Las regiones no traducidas 5' y 3' presentes en cada producto de ARNm se representan como X e Y, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, como se indica a continuación.

ARNm de luciferasa de luciérnaga (FFL) optimizado con codón: **SEQ ID NO: 1**

XAUGGAAGAUGCCAAAAACAUAAGAAGGGCCCAGCGCCAUUCUACCCACUCGAAGACGGGA
CCGCCGGCGAGCAGCUGCACAAAGCCAUGAAGCGCUACGCCUGGUGCCCGGCCACCAUCGCC
UUUACCGACGCACAUAUCGAGGUGGACAUUACCUACGCCGAGUACUUCGAGAUGAGCGUUCG
GCUGGCAGAAAGCUAUGAAGCGCUAUGGGCUGAAUACAAACCAUCGGAUCGUGGUGUGCAGCG
AGAAUAGCUUGCAGUUCUUAUGCCCGUGUUGGGUGCCCUGUUAUCGGUGUGGCUGUGGCC
CCAGCUAACGACAUCUACAACGAGCGCGAGCUGCUGAACAGCAUGGGGCAUCAGCCAGCCAC
CGUCGUUUUCGUGAGCAAGAAAGGGCUGCAAAGAUAUCCUACAACGUGCAAAAGAAGCUACCGA
UCAUACAAAAGAUCAUCAUGGAUAGCAAGACCGACUACCAGGGCUUCCAAAGCAUGUAC
ACCUUCGUGACUUCUCCAUUUGCCACCCGGCUUCAACGAGUACGACUUCGUGCCCGAGAGCUU
CGACCGGGACAAAACCAUCGCCUGAUGAACAGUAGUGGCAGUACCGGAUUGCCCAAGG
GCGUAGCCCUACCGCACCGCACCGCUUGUGUCCGAUUCAGUACGCCGCGACCCCAUCUUC
GGCAACCAGAUCAUCCCCGACACCGCUAUCCUCAGCGUGGUGCCAUUUACCCACGGCUUCGG
CAUGUUCACCCACGCUUGGGCUACUUGAUCUGCGGCUUUCGGGUGGUGCUCAUGUACCGCUUCG
AGGAGGAGCUAUUCUUGCGCAGCUUGCAAGACUAUAAGAUUCAAUCUGCCCUGCUGGUGCCC
ACACUAUUUAGCUUCUUCGCUAAGAGCACUCUCAUCGACAAGUACGACCUAAGCAACUUGCA
CGAGAUCGCCAGCGGGCGGGCGCCGCUAGCAAGGAGGUAGGUGAGGCCGUGGCCAAACGCU
UCCACCUACCAGGCAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACAGAAACAACAGCGCCAUCUGAUC
ACCCCGAAGGGGACGACAAGCCUGGCGCAGUAGGCAAGGUGGUGCCCUUCUUCGAGGCUAA
GGUGGUGGACUUGGACACCGGUAAGACACUGGGUGUGAACAGCGCGGCGAGCUGUGCGUCC
GUGGCCCAUGAUCAUGAGCGGCUACGUUAAACAACCCGAGGCUACAAACGCUCUCAUCGAC
AAGGACGGCUGGUGCAGCGGGCGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUCAU
CGUGGACCGGCUGAAGAGCCUGAUCAAUAAGGGCUACCGAGGUAGCCCCAGCCGAACUGG
AGAGCAUCCUGCUGCAACACCCCAACAUCUUCGACGCCGGGUGCGCGGCCUGCCCGACGAC
GAUGCCGGCGAGCUGCCCGCCGAGUCGUCGUGCUGGAACACGGUAAAACCAUGACCGAGAA
GGAGAUCGUGGACUAUGUGGCCAGCCAGGUUACAACCGCCAAGAAGCUGCGCGGUGGUGUUG
UGUUCGUGGACGAGGUGCCUAAAGGACUGACCGGCAAGUUGGACGCCCGCAAGAUCGCGGAG
AUUCUCAUUAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCGCCGUGUA**Y**

X = GGGAUCCUACC (SEQ ID NO: 2)

Y = UUUGAAUU (SEQ ID NO: 3)

Luego, se desnaturalizaron 0,25 mg del ARNm de FFL calentándolos a 70° C durante 5 minutos usando un bloque de calor. Se preparó un volumen de 11 ml de una solución tamponada acuosa (citrato 10 mM/NaCl 150 mM,

pH 4,5) y se calentó en un tubo cónico libre de ARNasa de 50 ml colocando el tubo en un baño de agua caliente, y dentro del cual se siguió con la adición instantánea del ARNm de CO-FFL desnaturalizado en la solución tamponada acuosa calentada para lograr una concentración final de ARNm de FFL de 1 mg/11 ml.

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

Para preparar las nanopartículas lipídicas, se mezclaron alícuotas de 50 mg/ml de soluciones etanólicas de HGT4002, DOPE, colesterol y DMG-PEG2000 como se indica en la Tabla 4 a continuación, se calentaron para asegurar la disolución y se diluyeron con etanol. La solución de lípidos resultante es adecuada para 0,25 mg de ARNm con una relación N/P de 4.

Tabla 4

Componentes Lipídicos	Relación Molar	MW	μmol	Peso (mg)	Volumen (μL)
DMG-PEG2000	10	2509.19	2.50	6.3	125.5
HGT4002	50	506	12.50	6.3	126.5
CHOL	20	386.65	5.0	1.9	38.7
DOPE	20	744.03	5.0	3.7	74.4
<i>Total</i>	<i>100</i>	<i>--</i>	<i>25.00</i>	<i>18.3</i>	<i>365.0</i>

Se inyectaron rápidamente 3,0 ml de la solución de lípidos etanólica en la solución de ARNm/tampón acuosa calentada (70° C), se agitó y la suspensión resultante se devolvió rápidamente al baño de agua a 70° C. La suspensión de nanopartículas resultante se concentró, se volvió a suspender en un tampón de borato de sodio (pH 8,0), se pasó a través de membranas MUSTANG Q (Pall Life Sciences), se filtró y se diafiltró con 1x PBS (pH 7,4) y se concentró adicionalmente. La Z_{ave} de las nanopartículas lipídicas resultantes fue de 58,40 nm ($Dv_{(50)} = 44,7$ nm; $Dv_{(90)} = 65,1$ nm) y el potencial Zeta medio fue de +7,8 mV. La encapsulación del ARNm se calculó realizando el ensayo Ribogreen con y sin la presencia de Triton-X 100 al 0,1% y se determinó que era del 88,56%.

Se preparó una solución madre 0,1 M que comprendía el agente reductor *tris*(2-carboxietil)fosfina (TCEP) disolviendo 28,7 mg de TCEP en 1 ml de agua. Las nanopartículas lipídicas se expusieron luego a soluciones acuosas que comprendían el TCEP y se evaluó el potencial Zeta de la nanopartícula lipídica. La exposición de las nanopartículas lipídicas a 39 μl (10X) de una solución de TCEP durante tres horas hizo que el potencial Zeta de la nanopartícula lipídica disminuyese a -17,1 mV. La exposición de las nanopartículas lipídicas a 19,5 μl (5X) de una solución de TCEP durante una hora hizo que el potencial Zeta de la nanopartícula lipídica se redujera a -4,15 mV. Lo anterior apoya la conclusión de que tras la exposición a un agente reductor, la carga (es decir, el potencial Zeta) de las nanopartículas lipídicas basadas en HGT4002 puede modularse y, en ciertos casos, neutralizarse.

Ejemplo 5

El presente ejemplo ilustra que las nanopartículas lipídicas basadas en HGT4002 pueden neutralizarse reductivamente después de haber sido cargadas con constructos de polinucleótidos de ARNm. Las nanopartículas lipídicas basadas en HGT4002 se formaron mediante métodos estándar de inyección de etanol como se describe a continuación. (Ponsa, et al., Int. J. Pharm. (1993) 95: 51-56.) Se prepararon soluciones madre etanólicas de los lípidos por anticipado a una concentración de 50 mg/ml y se almacenaron a -20° C.

Se sintetizó ARNm de luciferasa de luciérnaga optimizado con codón (CO-FFL) mediante transcripción *in vitro* a partir de una plantilla de ADN plasmídico que codifica el gen, que fue seguido por la adición de una estructura de tapa 5' (Cap1) (Fechter, P. et al., J. Gen. Virology (2005) 86: 1239-1249) y una cola de poli(A) 3' de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud según se determinó por electroforesis en gel. Las regiones no traducidas 5' y 3' presentes en cada producto de ARNm se representan como X e Y, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, como se enumera a continuación.

ARNm de luciferasa de luciérnaga (FFL) optimizado con codón: **SEQ ID NO: 1**

XAUGGAAGAUGCCAAAAACAUAAGAAGGGCCCAGCGCCAUUCUACCCACUCGAAGACGGGA
CCGCCGCGCAGCAGCUGCACAAAGCCAUGAAGCGCUACGCCUGGUGCCCGGCCACCAUCGCC
UUUACCGACGCACAUAUCGAGGUGGACAUUACCUACGCCGAGUACUUCGAGAUGAGCGUUCG

GCUGGCAGAAGCUAUGAAGCGCUAUGGGGUGAAUACAAACCAUCGGAUCGUGGUGUGCAGCG
 AGAAUAGCUUGCAGUUCUUAUGCCCGUGUUGGGUGCCCGUGUUCUUCGUGUGGUGUGGCC
 CCAGCUAACGACAUCUACAACGAGCGCGAGCUGCUGAACAGCAUGGGCAUCAGCCAGCCCAC
 5 CGUCGUAUUCGUGAGCAAGAAAGGGCUGCAAAAGAUCUCAAACGUGCAAAAGAAGCUACCGA
 UCAUACAAAAGAUCAUCAUCAUGGAUAGCAAGACCGACUACCAGGGCUUCCAAAGCAUGUAC
 ACCUUCGUGACUUCUCCAUUUGCCACCCGGCUUCAAACGAGUACGACUUCGUGGCCCGAGAGCUU
 CGACCGGGACAAAACCAUCGCCCGUGAUCAUGAACAGUAGUGGCAGUACCGGAUUGCCCAAGG
 10 GCGUAGCCCUACCGCACCGCACCGCUUGUGUCCGAUUCAGUCAUGCCCGCGACCCCAUCUUC
 GGCAACCAGAUCAUCCCGACACCGCUAUCCUCAGCGUGGUGCCAUUUCACCACGGCUUCGG
 CAUGUUCACCACGUGGGCUACUUGAUCUGCGGCUUUCGGGUGGUGCUCAUGUACCGCUUCG
 AGGAGGAGCUAUUCUUGCGCAGCUUGCAAGACUAUAAGAUUCAAUCUGCCCUGCUGGUGCCC
 15 ACACUAUUUAGCUUCUUCGCUAAGAGCACUCUCAUCGACAAGUACGACCUAAGCAACUUGCA
 CGAGAUCGCCAGCGGGCGGGCGCCGCUACAGCAAGGAGGUAGGUGAGGCCGUGGCCAAACGCU
 UCCACCUACCAGGCAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACAGAAACAACCAGCGCCAUUCUGAUC
 ACCCCGAAGGGGACGACAAGCCUGGCGCAGUAGGCAAGGUGGUGCCCUUCUUCGAGGCUAA
 20 GGUGGUGGACUUGGACACCGGUAAGACACUGGGUGUGAACCAGCGCGGGCAGCUGUGCGUCC
 GUGGCCCAUGAUCAUGAGCGGCUACGUUAACAACCCCGAGGCUACAAACGCUCUCAUCGAC
 AAGGACGGCUGGUGCAGCAGCGGCGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUCAU
 CGUGGACCGGCGUGAAGAGCCUGAUCAAUACAAGGGCUACCAGGUAGCCCCAGCCGAACUGG
 25 AGAGCAUCCUGCUGCAACACCCCAACAUCUUCGACGCCGGGGUGCGCGGCCUGCCCGACGAC
 GAUGCCGGCGAGCUGCCCGCCGCGAGUCGUCGUGCUGGAACACGGUAAAACCAUGACCGAGAA
 GGAGAUCGUGGACUAUGUGGCCAGCCAGGUUACAACCGCCAAGAAGCUGCGCGGUGGUGUUG
 UGUUCGUGGACGAGGUGCCUAAAGGACUGACCGGCAAGUUGGACGCCCCGAAGAUCGCGGAG
 30 AUUCUCAUUAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCGCCGUGUA^Y

X = GGAUCCUACC (SEQ ID NO: 2)

Y = UUUGAAUU (SEQ ID NO: 3)

Luego, se desnaturalizaron 0,25 mg del ARNm de FFL calentándolos a 70° C durante 5 minutos usando un bloque de calor. Se preparó un volumen de 11 ml de una solución tamponada acuosa (citrate 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) y se calentó en un tubo cónico libre de ARNasa de 50 ml colocando el tubo en un baño de agua caliente, y dentro del cual se siguió con la adición instantánea del ARNm de CO-FFL desnaturalizado en la solución tamponada acuosa calentada para lograr una concentración final de ARNm de FFL de 1 mg/11 ml.

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

Para preparar las nanopartículas lipídicas, se mezclaron alícuotas de 50 mg/ml de soluciones etanólicas de HGT4002, DOPE, colesterol y DMG-PEG2000 como se indica a continuación en la Tabla 5, se calentaron para asegurar la disolución y se diluyeron con etanol. La solución de lípidos resultante es adecuada para 0,25 mg de ARNm con una relación N/P de 4.

Tabla 5

Componentes Lipídicos	Relación Molar	MW	μmol	Peso (mg)	Volumen (μL)
DMG-PEG2000	10	2509.19	2.50	6.3	125.5
HGT4002	50	506	12.50	6.3	126.5
CHOL	20	386.65	5.0	1.9	38.7
DOPE	20	744.03	5.0	3.7	74.4
<i>Etanol Total (adicional)</i>	<i>100</i>	<i>--</i>	<i>25.00</i>	<i>18.3</i>	<i>365.0</i>
	<i>--</i>	<i>--</i>	<i>--</i>	<i>--</i>	<i>2635.0</i>
<i>Volumen Final</i>					<i>3000.0</i>

Se inyectaron rápidamente 3,0 ml de la solución de lípidos etanólica en la solución de ARNm/tampón acuosa calentada (70° C), se agitó y la suspensión resultante se devolvió rápidamente al baño de agua a 70° C. La suspensión de nanopartículas resultante se concentró, se volvió a suspender en un tampón de borato de sodio (pH 8,0), se pasó a través de membranas MUSTANG Q (Pall Life Sciences), se filtró y se diafiltró con 1x PBS (pH 7,4) y se concentró adicionalmente. La Z_{ave} de las nanopartículas lipídicas resultantes fue de 66,43 nm ($Dv_{(50)} = 38,7$ nm; $Dv_{(90)} = 67,9$ nm) y el potencial Zeta medio fue de aproximadamente 25,0 mV. La encapsulación del ARNm se calculó realizando el ensayo Ribogreen con y sin la presencia de Triton-X 100 al 0,1% y se determinó que era del 70,79%.

Se preparó una solución madre 0,1 M que comprendía el agente reductor *tris*(2-carboxietil)fosfina (TCEP) disolviendo 28,7 mg de TCEP en 1 ml de agua. Las nanopartículas lipídicas se expusieron luego a soluciones acuosas que comprendían TCEP y se evaluó el potencial Zeta de la nanopartícula lipídica. La exposición de las nanopartículas lipídicas a 19,5 μ l (5X) de una solución de TCEP durante una hora hizo que el potencial Zeta de la nanopartícula lipídica se redujera a 14,9 mV. Lo anterior apoya la conclusión de que tras la exposición a un agente reductor, la carga (es decir, el potencial Zeta) de las nanopartículas lipídicas basadas en HGT4002 puede modularse y, en ciertos casos, neutralizarse.

LISTADO DE SECUENCIAS

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

<120> Nanopartículas neutras derivadas de lípidos

<130> 2006685-0287

<150> 61/617,478

<151> 2012-03-29

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1671

<212> ARN

<213> Photinus pyralis

<400> 1

ES 2 858 523 T3

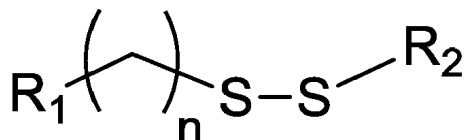
	gggauccuac	cauggaagau	gccaaaaaca	uuaagaagg	cccagcgcca	uucuacccac	60
	ucgaagacgg	gaccgcccgc	gagcagcugc	acaagccau	gaagcgcuac	gcccugggugc	120
5	ccggcaccu	cgccuuuacc	gacgcacaua	ucgaggugga	cauuaccuac	gccgaguacu	180
	ucgagaugag	cguucggcug	gcagaagcua	ugaagcgcu	ugggcugaau	acaaaccauc	240
10	ggaucguggu	gugcagcgag	aaugcuugc	aguucuuc	gcccugguug	ggugcccugu	300
	ucaucggugu	ggcuguggcc	ccagcuacg	acauacuac	cgagcgcgag	cugcugaaca	360
	gcaugggcau	cagccagccc	accgucguau	ucgugagcaa	gaaagggcug	caaaagauc	420
15	ucaacgugca	aaagaagcua	ccgauc	aaaagauc	caucauggau	agcaagaccg	480
	acuaccaggg	cuuccaaagc	auguacaccu	ucgugacuuc	ccauuugcca	cccggcuuca	540
20	acgaguacga	cuucgugccc	gagagcuucg	accgggacaa	aaccaucgcc	cugaucauga	600
	acaguagugg	caguaccgga	uugcccaagg	gcguagcccu	accgcaccgc	accgcuugug	660
25	uccgauucag	ucaugcccgc	gacccccau	ucggcaacca	gaucacccc	gacaccgcua	720
	uccucagcgu	ggugccauuu	caccacggcu	ucggcauguu	caccacgcug	ggcuacuuga	780
	ucugcggcuu	ucgggucgug	cucauguacc	gcuucgagga	ggagcuauuc	uugcgagcu	840
30	ugcaagacua	uaagauuc	ucugcccugc	uggugcccac	acuauuuagc	uucuucgcua	900
	agagcacucu	caucgacaag	uacgaccuaa	gcaacuugca	cgagaucgcc	agcggcgggg	960
35	cgccgcucag	caaggaggua	ggugaggccg	uggccaaacg	cuuccaccua	ccaggcaucc	1020
	gccagggcua	cggccugaca	gaaacaacca	gcgccauuc	gaucacccc	gaaggggacg	1080
40	acaagccugg	cgcaguaggc	aagguggguc	ccuucucga	ggcuaggug	guggacuugg	1140
	acaccgguaa	gacacugggu	gugaaccagc	gcggcgagcu	gugcguccgu	ggccccauga	1200
45	ucaugagcgg	cuacguuaac	aaccccgagg	cuacaaacgc	ucucaucgac	aaggacggcu	1260
	ggcugcacag	cggcgacau	gccuacuggg	acgaggacga	gcacuucuu	aucguggacc	1320
	ggcugaagag	ccugaucaaa	uacaagggcu	accagguagc	cccagccgaa	cuggagagca	1380
50	uccugcugca	acaccccaac	aucuucgacg	ccggggucgc	cggccugccc	gacgacgaug	1440
	ccggcgagcu	gcccgcgcga	gucgucgugc	uggaacacgg	uaaaaccaug	accgagaagg	1500
55	agaucgugga	cuauguggcc	agccagguaa	caaccgcaa	gaagcugcgc	ggugguguug	1560
	uguucgugga	cgaggugccu	aaaggacuga	ccggcaagu	ggacgcccgc	aagaucgcgc	1620
60	agauucuc	uaaggccaag	aagggcggca	agaucgccc	guauuugaau	u	1671
	<210> 2						
	<211> 11						
	<212> ARN						
65	<213> Homo sapiens						

	<400> 2
	gggauccuac c 11
5	<210> 3
	<211> 8
	<212> ARN
	<213> Homo sapiens
10	<400> 3
	uuugaauu 8

REIVINDICACIONES

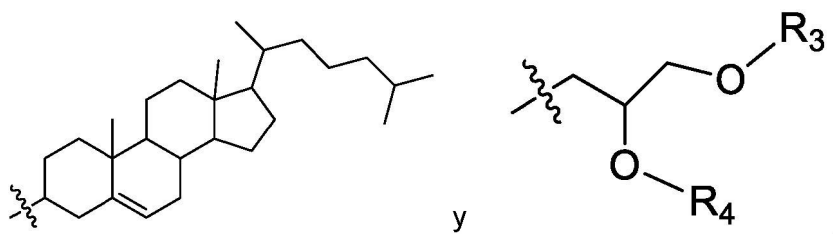
1. Un método para encapsular uno o más agentes terapéuticos en una nanopartícula lipídica neutra, dicho método comprendiendo los pasos de: (a) cargar una nanopartícula lipídica que comprende por lo menos un lípido catiónico reducible con el uno o más agentes terapéuticos; y (b) poner en contacto la nanopartícula lipídica con uno o más agentes reductores de tal manera que la nanopartícula lipídica se neutralice;

en donde dicho lípido catiónico reducible tiene la estructura:



en donde R_1 es un grupo de cabeza polar liberable y se selecciona del grupo que consiste de imidazol, guanidina, imina, enamina, amino, un alquil amino opcionalmente sustituido y un piridilo opcionalmente sustituido;

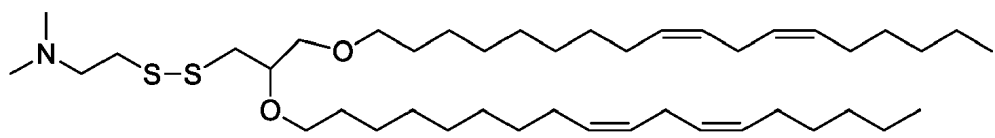
en donde R_2 se selecciona del grupo que consiste de



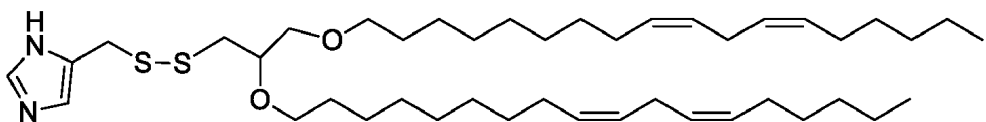
en donde R_3 y R_4 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de un alquilo C_6 - C_{20} opcionalmente sustituido, variablemente saturado o insaturado y un acilo C_6 - C_{20} opcionalmente sustituido, variablemente saturado o insaturado;

en donde n es cero o cualquier número entero positivo.

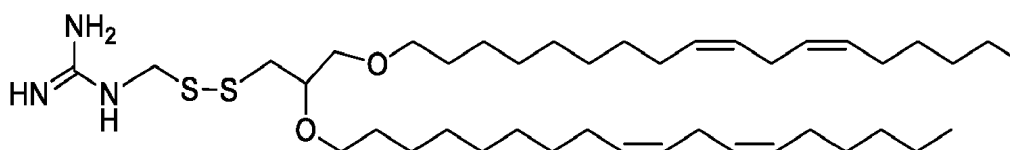
2. El método de la reivindicación 1, en el que el lípido catiónico reducible tiene una de las estructuras siguientes:



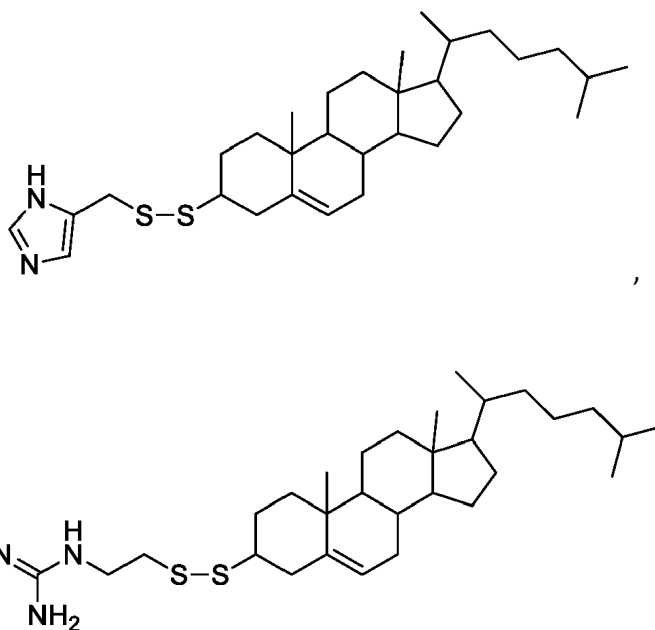
o



o



3. El método de la reivindicación 1, en el que el lípido catiónico reducible tiene una de las estructuras siguientes:



4. El método de la reivindicación 1, en el que el uno o más agentes reductores se seleccionan del grupo que consiste de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), β -mercaptoetanol (β -ME), ditioneitol (DTT), glutatión, ditioneitol y combinaciones de los mismos.

5. El método de la reivindicación 1, en el que la nanopartícula lipídica se pone en contacto con el agente reductor durante por lo menos cinco minutos, durante por lo menos 1 hora, durante por lo menos 3 horas o durante por lo menos 24 horas.

6. El método de la reivindicación 1, en el que el potencial zeta de la nanopartícula lipídica es de por lo menos 25 mV antes de poner en contacto la nanopartícula lipídica con el agente reductor y menos de 5 mV, de -25,0 mV a 5,0 mV o de -10,0 a 5,0 mV después de poner en contacto la nanopartícula lipídica con el agente reductor.

7. El método de la reivindicación 1, en el que el agente terapéutico comprende uno o más polinucleótidos.

8. El método de la reivindicación 7, en el que los polinucleótidos tienen enlaces internucleotídicos de fosforotioato en cada enlace internucleotídico.

9. El método de la reivindicación 7, en el que

(a) el uno o más polinucleótidos comprenden ARNm, opcionalmente en donde:

(i) el ARNm comprende una o más modificaciones de nucleótidos seleccionadas del grupo que consiste de: Ácido Nucleico Bloqueado (LNA); unidades de 2'-O-alkil-ARN, unidades de 2'-OMe-ARN, unidades de 2'-amino-ADN y unidades de 2'-fluoro-ADN, o

(ii) el ARNm comprende por lo menos un nucleótido modificado seleccionado independientemente del grupo que consiste de 5-metilcitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, pseudouridina, 2-tiouridina, diaminopurina y 2-cloro-6-aminopurina, o

(b) el uno o más polinucleótidos se seleccionan del grupo que consiste de un oligonucleótido antisentido, ARNip, ARNm, ARNsno y combinaciones de los mismos, o

(c) el uno o más polinucleótidos comprende uno o más LNA, o

(d) el uno o más polinucleótidos comprenden ADN.

10. El método de la reivindicación 7, en el que el uno o más polinucleótidos comprenden ARN, opcionalmente en donde:

(i) el ARN se selecciona del grupo que consiste de ARNm, ARNip, ARNsno, microARN y combinaciones de los mismos, o

(ii) el ARN codifica una proteína o enzima,

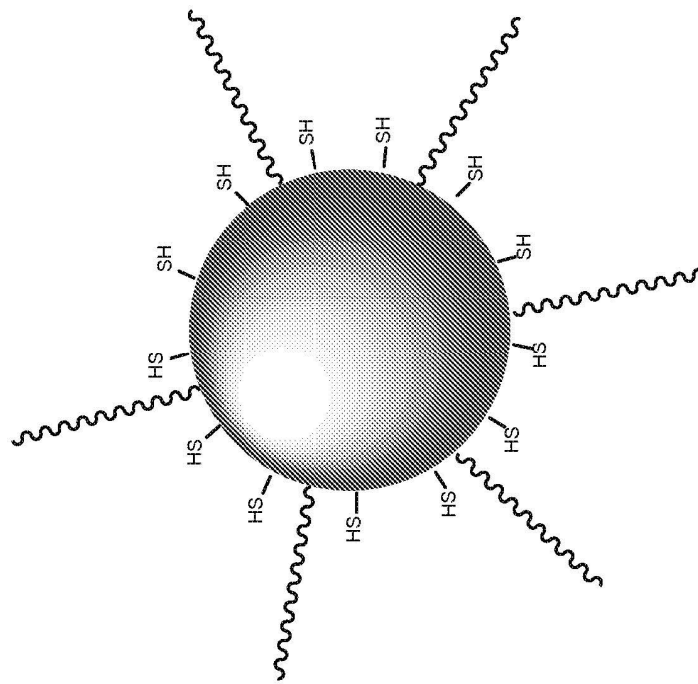
opcionalmente en donde la proteína o enzima se selecciona del grupo que consiste de hormona de crecimiento

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

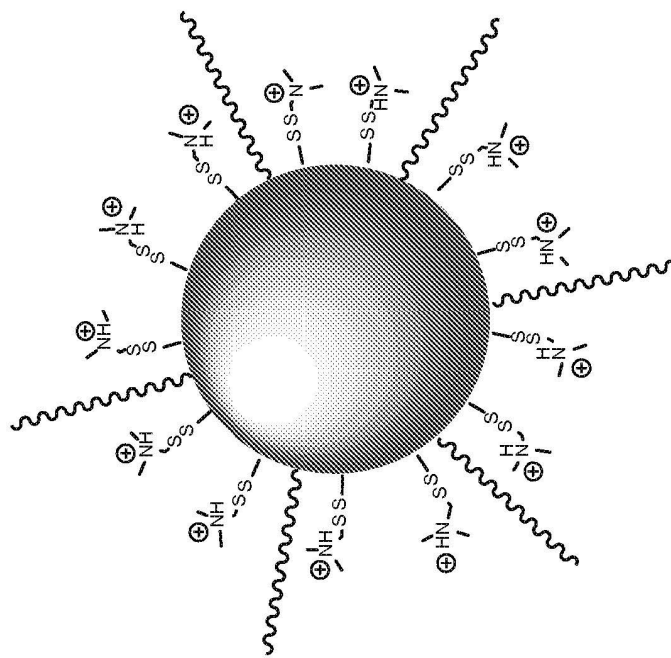
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que la nanopartícula lipídica neutralizada comprende entre 0,025 μ g/ml y 250 μ g/ml, por ejemplo, por lo menos 0,1 μ g/ml o por lo menos 0,5 μ g/ml de polinucleótido encapsulado.

12. Una nanopartícula lipídica neutra que tiene uno o más agentes terapéuticos encapsulados preparados de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11.

13. Una nanopartícula lipídica neutra que tiene uno o más agentes terapéuticos encapsulados de la reivindicación 12 para su uso en terapia.



Agente Reductor



Encapsular

Neutralizar

Figura 1

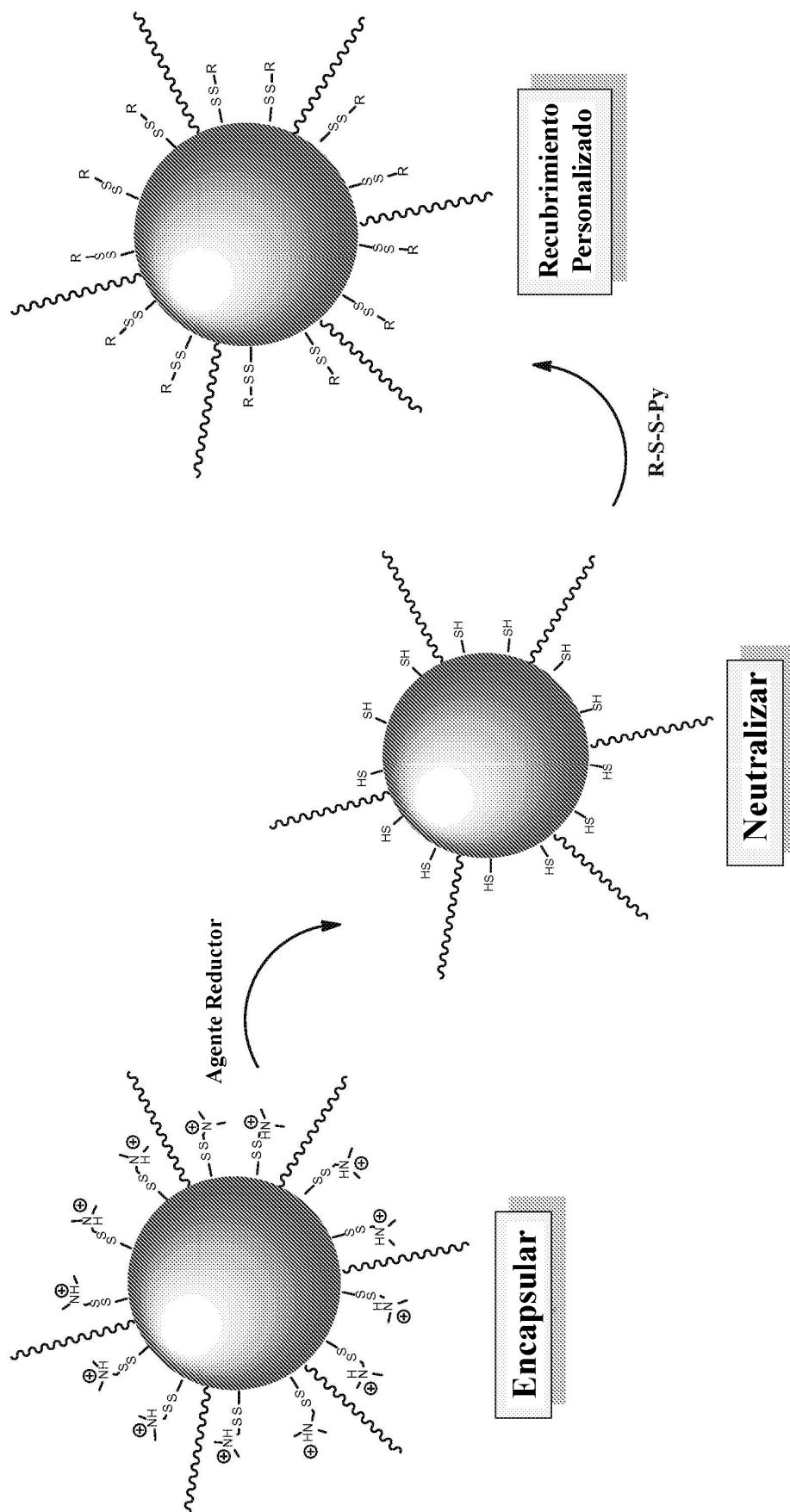


Figura 2