

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 020 935**

(51) Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 47/14 (2007.01)
A61K 47/28 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2018 PCT/US2018/022756**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2018 WO18170336**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2018 E 18715417 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2024 EP 3595727**

(54) Título: **Formulación de nanopartículas lipídicas**

(30) Prioridad:

15.03.2017 US 201762471949 P
22.03.2017 US 201762475166 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.05.2025

(73) Titular/es:

MODERNATX, INC. (50.00%)
325 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US y
OREGON STATE UNIVERSITY (50.00%)

(72) Inventor/es:

PATEL, SIDDHARTH;
ROBINSON, EMILY;
BROWN, ANNA;
ALMARSSON, ORN;
BENENATO, KERRY E.;
SABNIS, STACI;
SAHAY, GAURAV y
NARAYANA, ASHWANI KUMAR

(74) Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 3 020 935 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

Formulación de nanopartículas lipídicas

5 Solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad y beneficio de las solicitudes provisionales estadounidenses números 62/471,949, presentada el 15 de marzo de 2017; y 62/475,166, presentada el 22 de marzo de 2017.

10 Listado de secuencias

La presente solicitud se deposita junto con un Listado de Secuencias en formato electrónico. El listado de secuencias se proporciona como un archivo titulado "MRNA036001WOSequenceListing.txt" creado el 26 de febrero de 2018, que tiene un tamaño de 661 bytes.

15 Antecedentes de la descripción

La administración dirigida y eficaz de sustancias biológicamente activas, tales como fármacos de moléculas pequeñas, proteínas y ácidos nucleicos, representa un desafío médico continuo. En particular, la entrega de 20 ácidos nucleicos a las células se ve dificultada por la relativa inestabilidad y la baja permeabilidad celular de dichas especies. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar métodos y composiciones para facilitar la administración de agentes terapéuticos y/o profilácticos, tales como ácidos nucleicos a las células.

25 Las composiciones de nanopartículas que contienen lípidos, liposomas y lipoplexos han demostrado ser eficaces como vehículos de transporte hacia las células y/o compartimentos intracelulares para sustancias biológicamente activas tales como fármacos de moléculas pequeñas, proteínas y ácidos nucleicos. Dichas composiciones generalmente incluyen uno o más lípidos "catiónicos" y/o amino (ionizables), fosfolípidos que incluyen lípidos poliinsaturados, lípidos estructurales (*por ejemplo*, esteroles) y/o lípidos que contienen 30 polietilenglicol (lípidos PEG). Los lípidos catiónicos y/o ionizables incluyen, por ejemplo, lípidos que contienen aminas que pueden protonarse fácilmente. Aunque se ha demostrado una variedad de composiciones de nanopartículas que contienen lípidos, aún faltan mejoras en seguridad, eficacia y especificidad.

35 Se describen nanopartículas lipídicas ejemplares y composiciones relacionadas en los documentos WO2016/118724, WO2014/172045, WO2015/154002, US2014/134260, WO2012/000104. Se describen otras nanopartículas lipídicas y métodos para su uso en el documento WO2016/176330. Se describen métodos de uso de nanopartículas y composiciones lipídicas en el documento WO2016/118697.

Compendio de la descripción

40 La presente divulgación proporciona nuevas composiciones de nanopartículas.

En un aspecto, la divulgación proporciona una composición de nanopartículas que comprende un componente lipídico que comprende

45 un lípido ionizable,

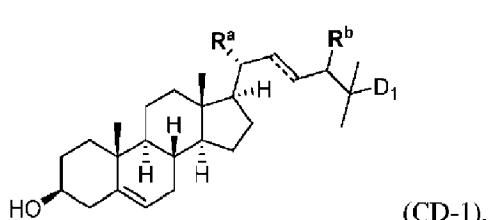
un fosfolípido,

un colesterol, y

50 un derivado del colesterol, en donde la relación molar entre el colesterol y el derivado del colesterol está entre aproximadamente 1:100 y 100:1; en donde el derivado del colesterol es:

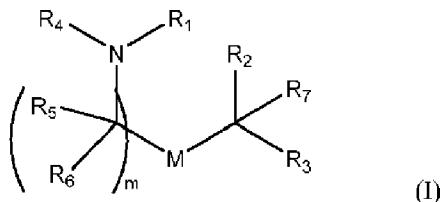
(a) β -sitosterol, campesterol, estigmasterol, fucosterol o estigmastanol; o

55 (b) un compuesto de fórmula (CD-1):



o una sal o isómero del mismo, en el que ---- denota un enlace simple o doble carbono-carbono; R^a es alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido con OH o halo; R^b es alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido con OH o halo; y D₁ es H o F.

- 5 En ciertas realizaciones, el lípido ionizable es un compuesto de Fórmula (I):



o su N-óxido, o una sal o isómero del mismo, en donde:

- 10 R₁ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₅₋₃₀, alquenilo C₅₋₂₀, -R^a*YR^b, -YR^b, y -R^a*M'R^b;
- R₂ y R₃ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C₁₋₁₄, alquenilo C₂₋₁₄, -R^a*YR^b, -YR^b y -R^a*OR^b o R₂ y R₃, junto con el átomo al que están unidos, forman un heterociclo o carbociclo;
- 15 R₄ se selecciona del grupo formado por hidrógeno, un carbociclo C₃₋₆, -(CH₂)_nQ, -(CH₂)_nCHQR, -CHQR, -CQ(R)₂, y alquilo C₁₋₆ sin sustituir, donde Q se selecciona de un carbociclo, heterociclo, -OR, -O(CH₂)_nN(R)₂, -C(O)OR, -OC(O)R, -CX₃, -CX₂H, -CXH₂, -CN, -N(R)₂, -C(O)N(R)₂, -N(R)C(O)R, -N(R)S(O)₂R, -N(R)C(O)N(R)₂, -N(R)C(S)N(R)₂, -N(R)R₈, -N(R)S(O)₂Rs, -O(CH₂)_nOR, -N(R)C(=NR₉)N(R)₂, -N(R)C(=CHR₉)N(R)₂, -OC(O)N(R)₂, -N(R)C(O)OR, -N(OR)C(O)R, -N(OR)S(O)₂R, -N(OR)C(O)OR, -N(OR)C(O)N(R)₂, -N(OR)C(S)N(R)₂, -N(OR)C(=NR₉)N(R)₂, -N(OR)C(=CHR₉)N(R)₂, -C(=NR₉)N(R)₂, -C(=NR₉)R, -C(O)N(R)OR, y -C(R)N(R)₂C(O)OR, y cada n se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4 y 5;
- 20 cada R₅ se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C₁₋₃, alquenilo C₂₋₃, y H;
- 25 cada R₆ se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C₁₋₃, alquenilo C₂₋₃, y H;
- M y M' se seleccionan independientemente de -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)-M''-C(O)O-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(S)S-, -SC(S)-, -CH(OH)-, -P(O)(OR')O-, -S(O)₂-, -S-S-, un grupo arilo y un grupo heteroarilo, en el que M'' es un enlace, un alquilo C₁₋₁₃ o un alquenilo C₂₋₁₃;
- 30 R₇ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁₋₃, alquenilo C₂₋₃, y H;
- R₈ se selecciona del grupo que consiste en carbociclo y heterociclo C₃₋₆;
- 35 R₉ se selecciona del grupo que consiste en H, CN, NO₂, alquilo C₁₋₆, -OR, -S(O)₂R, -S(O)₂N(R)₂, alquenilo C₂₋₆, carbociclo y heterociclo C₃₋₆;
- cada R se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C₁₋₃, alquenilo C₂₋₃, y H;
- 40 cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C₁₋₁₈, alquenilo C₂₋₁₈, -R^a*YR^b, -YR^b, y H;
- cada R'' se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C₃₋₁₅ y alquenilo C₃₋₁₅;
- 45 cada R* se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C₁₋₁₂ y alquenilo C₂₋₁₂;
- cada Y es independientemente un carbociclo C₃₋₆;
- 50 cada X se selecciona independientemente del grupo que consiste en F, Cl, Br y I; y
- m es seleccionado de entre 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13.

Por ejemplo, cuando R₄ es -(CH₂)_nQ, -(CH₂)_nCHQR, -CHQR, o -CQ(R)₂, entonces (i) Q no es -N(R)₂ cuando n es 1, 2, 3, 4 o 5, o (ii) Q no es heterocicloalquilo de 5, 6, o 7 miembros cuando n es 1 o 2. Por ejemplo, R₁ es diferente de -(CHR₅R₆)_m-M-CR₂R₃R₇.

En otro aspecto, la divulgación presenta una composición farmacéutica que comprende la composición de nanopartículas descrita en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, la

- composición farmacéutica se refrigerá o congela para almacenamiento y/o transporte (por ejemplo, para almacenarse a una temperatura de 4 °C o menor, tal como una temperatura de aproximadamente -150 °C a aproximadamente 0 °C o de aproximadamente -80 °C a aproximadamente -20 °C (por ejemplo, aproximadamente -5 °C, -10 °C, -15 °C, -20 °C, -25 °C, -30 °C, -40 °C, -50 °C, -60 °C, -70 °C, -80 °C, -90 °C, -130 °C o -150 °C). Por ejemplo, la composición farmacéutica es una solución que se refrigerá para almacenamiento y/o transporte, por ejemplo, a aproximadamente -20 °C, -30 °C, -40 °C, -50 °C, -60 °C, -70 °C o -80 °C.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona la composición de nanopartículas descrita anteriormente para su uso en el tratamiento terapéutico o diagnóstico del cuerpo humano y/o animal en un método de administración de un agente terapéutico y/o profiláctico (*por ejemplo*, un ARNm) a una célula de mamífero, en donde la célula se pone en contacto con la composición de nanopartículas.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona la composición de nanopartículas descrita anteriormente para su uso en el tratamiento terapéutico o diagnóstico del cuerpo humano y/o animal en un método de administración específica de un agente terapéutico y/o profiláctico (*por ejemplo*, un ARNm) a un órgano de mamífero (*por ejemplo*, hígado, bazo, pulmón o fémur), en donde el órgano de mamífero se pone en contacto con la composición de nanopartículas.
- En otro aspecto más, la divulgación proporciona la composición de nanopartículas descrita anteriormente para su uso en el tratamiento terapéutico o de diagnóstico del cuerpo humano y/o animal en un método para producir un polipéptido de interés en una célula de mamífero, en donde la célula se pone en contacto con la composición de nanopartículas.
- En otro aspecto más, la divulgación proporciona la composición de nanopartículas anterior para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto (*por ejemplo*, un mamífero, *por ejemplo*, un ser humano) que lo necesita. El método incluye la etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de nanopartículas de la divulgación. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno se caracteriza por una actividad de polipéptidos o proteínas anómala o disfuncional. Por ejemplo, la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en enfermedades raras, enfermedades infecciosas, cáncer y enfermedades proliferativas, enfermedades genéticas (*por ejemplo*, fibrosis quística), enfermedades autoinmunitarias, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares y renovasculares, y enfermedades metabólicas. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno se caracteriza por la sobreexpresión de un polipéptido. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno se caracteriza por la subexpresión de un polipéptido. En algunas realizaciones, una nanopartícula de la divulgación comprende un ácido nucleico capaz de silenciar o disminuir la expresión de un polipéptido diana. En algunas realizaciones, una nanopartícula de la divulgación comprende un ácido nucleico capaz de expresar o aumentar la expresión de un polipéptido diana.
- Realizaciones adicionales de la invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas.
- Breve descripción de los dibujos
- Las características anteriores y otras se apreciarán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada cuando se tome en conjunción con los dibujos adjuntos.
- Las figuras 1A y 1B son un par de gráficos que ilustran los resultados de la eficiencia de transfección del ensayo de viabilidad celular/luciférica de (Figura 1A) células HeLa y (Figura 1B) células HepG2 tras el tratamiento con nanopartículas que contienen colesterol, beta-sitosterol y estigmasterol.
- Las figuras 2A y 2B son un par de gráficos que ilustran la expresión de la proteína fluorescente verde (eGFP) en células HeLa inducida por nanopartículas lipídicas de la divulgación, que comprenden el Compuesto 18, colesterol y/o un derivado del colesterol. Las partículas se formularon con un tampón acetato. Se muestran los niveles de captación y expresión celular de partículas que contienen colesterol pero no derivados del colesterol como control. La figura 2A muestra la expresión de eGFP mediante formulaciones de la divulgación a lo largo de 16 h. La figura 2B muestra el AUC de la expresión de eGFP para cada formulación.
- Las Figuras 3A y B son un par de gráficos que ilustran la expresión de la proteína verde fluorescente (eGFP) en células HeLa frente a la captación celular de nanopartículas lipídicas de la divulgación, que comprenden el Compuesto 18, colesterol y/o un derivado del colesterol, con un tampón acetato. La captación de lípidos se determinó mediante el marcaje con tetrametilrodamina (TRITC), más específicamente, utilizando 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(lisamina rodamina B sulfonilo) (sal de amonio). La figura 3A muestra la expresión de eGFP frente a la captación celular a lo largo de 16 h. La figura 3B muestra el AUC para cada formulación. El eje derecho de cada gráfico mide la expresión de eGFP y el eje izquierdo mide la captación de lípidos.

- Las Figuras 4A y 4B son un par de gráficos que ilustran la expresión de la proteína verde fluorescente (eGFP) en células Hep3b frente a la captación celular de nanopartículas lipídicas de la divulgación, que comprenden el Compuesto 18, colesterol y/o un derivado del colesterol, con un tampón acetato. La captación de lípidos se determinó mediante el marcaje con TRITC, más concretamente, utilizando 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(lisamina rodamina B sulfonilo) (sal de amonio). La Figura 4A muestra la expresión de eGFP frente a la captación celular en el transcurso de 16 h. La figura 4B muestra el AUC para cada formulación. El eje derecho de cada gráfico mide la expresión de eGFP y el eje izquierdo mide la captación de lípidos.
- 5 Las Figuras 5A y 5B son un par de gráficos que ilustran la expresión de la proteína verde fluorescente (eGFP) en células AML12 frente a la captación celular de nanopartículas lipídicas de la divulgación, que comprenden el Compuesto 18, colesterol y/o un derivado de colesterol, con un tampón de acetato. La captación de lípidos se determinó mediante el marcaje con TRITC, más concretamente, utilizando 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(lisamina rodamina B sulfonilo) (sal de amonio). La Figura 5A muestra la expresión de eGFP frente a la captación celular en el transcurso de 16 h. La figura 5B muestra el AUC para cada formulación. El eje derecho de cada gráfico mide la expresión de eGFP y el eje izquierdo mide la captación de lípidos.
- 10 Las Figuras 6A y 6B son un par de gráficos que muestran frecuencias de células B activadas en las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) dosificadas con las composiciones de la divulgación, que comprenden el Compuesto 18, colesterol y/o un derivado del colesterol, con un tampón acetato. Se utilizan únicamente lipopolisacárido (LPS) y medio de cultivo celular como controles. La figura 6A muestra el porcentaje de células CD19+. La figura 6B muestra el porcentaje de células CD19+ CD69+ CD86+.
- 15 Las figuras 6A y 6B son un par de gráficos que muestran frecuencias de células B activadas en las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) dosificadas con las composiciones de la divulgación, que comprenden el Compuesto 18, colesterol y/o un derivado del colesterol, con un tampón acetato. Se utilizan únicamente lipopolisacárido (LPS) y medio de cultivo celular como controles. La figura 6A muestra el porcentaje de células CD19+. La figura 6B muestra el porcentaje de células CD19+ CD69+ CD86+.
- 20 La Figura 7A ilustra la estructura de diferentes derivados del colesterol: (1.a) estructura del colesterol, (1.b) nomenclatura IUPAC (1989) del sistema de anillo de colesterol. (2.a) vitamina D-3, (2.b) vitamina D-2, (2.c) calcipotriol [la Sección 2 incluye 9,10-secosteroides], (3.a) estigmasterol, (3.b) beta-sitosterol [la Sección 3 incluye fitoesteroles con modificación de cadena lateral C-20 a C-27], (4.a) betulina, (4.b) lupeol, (4.c) ácido ursólico, (4.d) ácido oleanólico [la Sección 4 incluye fitoesteroles con modificación de cadena lateral C-20 a C-27 con un anillo adicional]. En todas las estructuras, el color rojo indica la variación estructural en comparación con el colesterol. El β-sitosterol tiene una pureza del 70 % y contiene una mezcla de campesterol, estigmasterol y sitostanol. En las Figuras 7B-7H, 8A-8C y 9A-9F, eLNP se refiere a nanopartículas lipídicas con colesterol reemplazado por derivados de colesterol, mientras que LNP, a menos que se especifique lo contrario, se refiere a nanopartículas lipídicas con colesterol.
- 25 La Figura 7B es un gráfico que muestra que las nanopartículas lipídicas de β-sitosterol (eLNP) superan a otras eLNP derivadas del colesterol con respecto al tamaño (determinado por DLS, media de 36–45 escaneos), eficiencia de encapsulación de ARNm (determinada por el ensayo RiboGreen, N = 2) y eficiencia de transfección (comparada mediante la adición de 200 ng de ARNm utilizando cada eLNP, normalizado a la transfección con LNP de colesterol, N = 3). El β-sitosterol tiene una pureza del 70 % y es una mezcla de campesterol, estigmasterol y sitostanol.
- 30 La Figura 7C es un gráfico que ilustra los resultados de la eficiencia de la transfección de un estudio en células HeLa de la actividad de la luciferasa normalizada a la viabilidad celular 24 horas después de la transfección con 0–400 ng de ARNm de luciferasa usando LNP (azul) o eLNP (rojo). Datos mostrados como media ± DE; N = 3.
- 35 La Figura 7D es un gráfico que ilustra los datos de la figura 8c, expresados como una relación de aumento (eLNP/LNP). Los datos se muestran como media ± DE; N = 3. El β-sitosterol tiene una pureza del 97 %.
- 40 La Figura 7E es un gráfico que ilustra la captación celular media de LNP frente a eLNP; determinada mediante la transfección de ARNm marcado con cianina 5 (0–400 ng de ARNm/pocillo) utilizando LNP frente a β-sitosterol-eLNP. Área de captación definida como espacio perinuclear identificado mediante tinción nuclear de Hoescht. La fluorescencia de cianina 5 está normalizada al número de núcleos. Datos mostrados como media ± DE; N = 3.
- 45 La figura 7F ilustra las estructuras de otros análogos de fitoesteroles. Todos son sustituyentes alquilo y alquenilo C-24 del colesterol. En todas las estructuras, el color rojo indica la variación estructural en comparación con el colesterol. El tamaño y E.eff se refieren al tamaño y la eficiencia de encapsulación de las nanopartículas lipídicas tal como se forman.
- 50 La Figura 7G es un gráfico que ilustra los resultados de la eficiencia de la transfección de un estudio en células HeLa de la actividad de la luciferasa normalizada a la viabilidad celular 24 horas después de la transfección con 0–400 ng de ARNm de luciferasa usando LNP (azul), β-sitosterol-eLNP (rojo), campesterol-eLNP (amarillo), fucosterol-eLNP (gris) o sitostanol-eLNP (verde). Datos mostrados como media ± DE; N = 3.
- 55 La figura 7H es un gráfico que ilustra las caracterizaciones de LNP de colesterol y conjugado de β-sitosterol. Tras la acetilación, se observa una pérdida de función tanto en los LNP de colesterol como de β-sitosterol, sin

- embargo, la conjugación de aminoácidos en este sitio puede restaurar parcialmente la funcionalidad. Se muestra: tamaño (determinado por DLS, media de 36-45 escaneos), eficiencia de encapsulación de ARNm (determinada por ensayo RiboGreen, $N = 2$) y eficiencia de transfección (comparada mediante la adición de 200 ng de ARNm utilizando cada eLNP, normalizado a la transfección con LNP de colesterol, $N = 3$). Las letras en los nombres de los compuestos representan H = Histidina, R = Arginina, G = Glicina, S = Serina, C = Cisteína, Ac = Acetilo. Los datos sugieren que el grupo OH es esencial para la administración de genes mediada por el colesterol.
- La Figura 8A es un gráfico que muestra los resultados de un estudio en seis líneas de células de fibroblastos distintas cultivadas de pacientes humanos con trastornos de almacenamiento lisosomal. Actividad de luciferasa normalizada a la viabilidad celular 24 horas después de la transfección con 0-600 ng de ARNm de luciferasa utilizando LNP (azul) o eLNP de β -sitosterol (rojo). Datos mostrados como media \pm DE; $N = 3$.
- La Figura 8B es un gráfico que muestra los resultados de un estudio en 3 líneas de células de macrófagos: células RAW264.7 y J774A.1 (ratón) y macrófagos de sangre periférica de un paciente humano aparentemente sano. Actividad de la luciferasa normalizada a la viabilidad celular 24 horas después de la transfección con 0-200 ng de ARNm de luciferasa utilizando LNP (azul) o β -sitosterol eLNP (rojo). Datos mostrados como media \pm DE; $N = 3$.
- La figura 8C es un gráfico que muestra los resultados de un estudio en células hepatocitos HepG2. Actividad de la luciferasa normalizada a la viabilidad celular 24 horas después de la transfección con 0-50 ng de ARNm de luciferasa utilizando LNP (azul) o β -sitosterol eLNP (rojo). Datos mostrados como media \pm DE; $N = 3$.
- La Figura 9A es un gráfico que ilustra la actividad de la luciferasa en células HeLa transfectadas con lipoplexos de ARNm a una dosis de 50 ng de ARNm en presencia de lípidos bioactivos (negro) normalizados con respecto al control de solo lipoplexos de ARNm (rojo), que se estableció al 100 %. Datos representados como media \pm SEM; $n = 3$. El compuesto N.º 2 (MK-571) en la biblioteca de lípidos bioactivos demuestra la bioactividad más favorable, induciendo una mejora de aproximadamente el 40 % en la expresión de proteínas sobre el control.
- La Figura 9B es un gráfico que ilustra la actividad de la luciferasa en células HeLa transfectadas con lipoplexos de ARNm a una dosis de 50 ng de ARNm en presencia de concentraciones variables de MK-571 (azul) en relación con el control de solo lipoplexos de ARNm (rojo). Datos representados como media \pm DE; $n = 3$. MK-571 es capaz de duplicar la expresión de proteína a una concentración de 5 μ M.
- La Figura 9C es un gráfico que ilustra la actividad de la luciferasa en células HeLa transfectadas con ARNm-lipoplex a una dosis de 50 ng de ARNm en presencia de concentraciones variables de ácido araquidónico (azul) en relación con el control de ARNm-lipoplex solo (rojo). Datos representados como media \pm DE; $n = 3$. El tratamiento de las células con ácido araquidónico libre no logró producir una mejora en la expresión de proteínas.
- La Figura 9D es un gráfico que ilustra la actividad de la luciferasa en dosis crecientes de ARNm en células HeLa transfectadas utilizando LNP, con y sin preincubación de 24 horas con MK-571 (5 μ M). Datos representados como media \pm DE; $n = 3$. MK-571 es capaz de mejorar la transfección en todas las dosis de ARNm.
- La Figura 9E es un gráfico que ilustra la actividad de la luciferasa a dosis crecientes de ARNm en células HeLa transfectadas utilizando LNP y LNP cargadas con MK-571. Datos representados como media \pm DE; $n = 3$. De manera similar a las observaciones realizadas utilizando lipoplexes y MK-571 libre, el MK-571 administrado mediante LNP aumenta la expresión de la proteína al doble.
- La Figura 9F es un gráfico que ilustra la actividad de la luciferasa en células HeLa transfectadas con lipoplexos de ARNm a una dosis de 50 ng de ARNm en presencia de concentraciones variables de MK-571 o sus análogos, Montelukast, Pranlukast y Zafirlukast en relación con el control de solo lipoplexos de ARNm. Datos representados como media \pm DE; $n = 3$. Pranlukast y Zafirlukast demuestran una actividad similar a MK-571 para mejorar la expresión de proteínas.

Descripción detallada

- La divulgación se refiere a nuevas composiciones de nanopartículas lipídicas que incluyen un nuevo esterol, o una mezcla de esteroles, en particular, una mezcla de colesterol y derivado de colesterol (por ejemplo, reemplazo total o parcial de colesterol en composiciones de nanopartículas). Sin querer limitarnos a la teoría, el reemplazo total o parcial del colesterol puede alterar el transporte intracelular de lípidos al modular la unión con Niemann-Pick C1 (NPC1, una proteína de membrana endosómica tardía que media el tráfico intracelular de colesterol en mamíferos) para mejorar la captación celular de las nanopartículas lipídicas, por ejemplo, para aumentar la cantidad de ARNm entregados al citoplasma que estarían disponibles para la traducción. Además o alternativamente, el reemplazo total o parcial del colesterol puede alterar el transporte de lípidos intracelulares

al modular la unión con NPC1 para mejorar la expresión de una proteína de interés. Es posible que los derivados del colesterol sean más eficaces en la unión al dominio de nucleótidos NPC1 que se une al grupo OH de los esteroles y puedan causar el escape endosómico al retículo endoplásmico. El bloqueo del grupo OH provoca una disminución de la eficacia. Sin embargo, la ausencia de NPC1 aún condujo a una mejor administración, posiblemente debido a la activación de vías compensatorias en el sistema endolisosomal (véase, por ejemplo, la Figura 7H y la Figura 8A). Es posible que el derivado del colesterol pueda cambiar la afinidad de unión con diferentes proteínas endolisosomales como Npc1, LIMP2, LAMPA y B.

La divulgación también proporciona métodos para administrar un agente terapéutico y/o profiláctico a una célula de mamífero, específicamente administrar un agente terapéutico y/o profiláctico a un órgano de mamífero, producir un polipéptido de interés en una célula de mamífero y tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero que lo necesite. Las referencias a métodos de tratamiento mediante terapia o diagnóstico en esta descripción deben interpretarse como referencias a composiciones de nanopartículas para su uso en esos métodos. Por ejemplo, un método para producir un polipéptido de interés en una célula implica poner en contacto una composición de nanopartículas que comprende un ARNm con una célula de mamífero, con lo cual ARNm puede traducirse para producir el polipéptido de interés. Por ejemplo, la producción del polipéptido de interés aumenta (por ejemplo, al menos en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o 100 %) mediante el uso de una combinación de primer y segundo esteroles (por ejemplo, colesterol y un derivado del colesterol como estigmasterol, β-sitosterol o los descritos en el presente documento) en comparación con la administración de una composición correspondiente que comprende el primer esterol o el segundo esterol, pero no ambos. En otro ejemplo, la producción del polipéptido de interés se incrementa (por ejemplo, en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o 100 %) utilizando un derivado del colesterol (como estigmasterol, β-sitosterol o los aquí divulgados) en comparación con la administración de una composición correspondiente que comprende colesterol o una combinación de colesterol y el derivado del colesterol. Un método para administrar un agente terapéutico y/o profiláctico a una célula u órgano de un mamífero puede implicar la administración de una composición de nanopartículas que incluye el agente terapéutico y/o profiláctico a un sujeto, en donde la administración implica poner en contacto la célula u órgano con la composición, con lo cual el agente terapéutico y/o profiláctico se administra a la célula u órgano. Por ejemplo, la eficacia de administración se incrementa (por ejemplo, en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o 100 %) utilizando una combinación de primer y segundo esteroles (por ejemplo, colesterol y un derivado del colesterol como estigmasterol, β-sitosterol, o los descritos en el presente documento) en comparación con la administración de una composición correspondiente que comprende el primer esterol o el segundo esterol, pero no ambos. En otro ejemplo, la eficacia de administración se incrementa (por ejemplo, en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o 100 %) utilizando un derivado del colesterol (como el estigmasterol, el β-sitosterol o los descritos en el presente documento) en comparación con la administración de una composición correspondiente que comprende colesterol o una combinación de colesterol y el derivado del colesterol.

Esteroles

La divulgación proporciona una composición de nanopartículas que comprende un componente lipídico que comprende un lípido ionizable, un fosfolípido, un primer esterol o un tocoferol, y opcionalmente un segundo esterol diferente del primer esterol en donde la relación molar entre el primer y el segundo esterol está entre aproximadamente 1:100 y 100:1, o la relación molar entre el tocoferol y el segundo esterol está entre aproximadamente 1:100 y 100:1.

La divulgación también proporciona una composición de nanopartículas que comprende:

un lípido ionizable; un fosfolípido; un tensioactivo; un resto de ácido nucleico; y un derivado del colesterol.

El término "esterol" se refiere a un subgrupo de esteroides también conocidos como alcoholes esteroides. Los esteroles generalmente se dividen en dos clases: (1) esteroles vegetales, también conocidos como

"fitoesteroles", y (2) esteroles animales, también conocidos como "zooesteroles".

En ciertos ejemplos, la composición incluye un segundo esterol. Por ejemplo, la relación molar entre el primer y el segundo esterol está entre aproximadamente 1:10 y 10:1, o entre aproximadamente 1:5 y 5:1, o entre

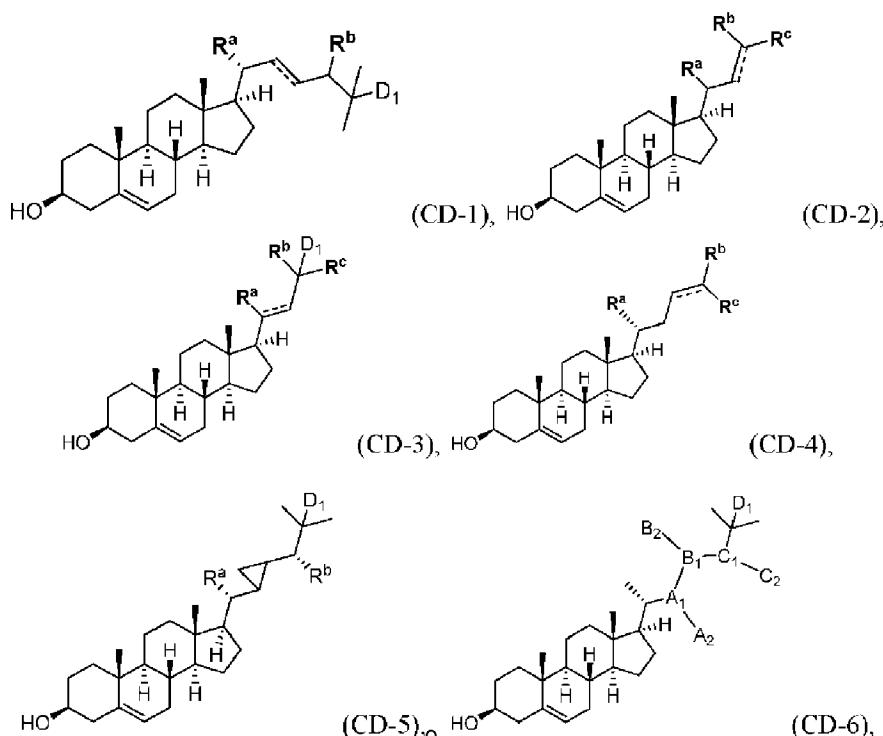
- 5 aproximadamente 1:3 y 3:1, o entre aproximadamente 1:2 y 2:1, o aproximadamente 1:1. Por ejemplo, la relación molar entre el tocoferol y el segundo esterol está entre aproximadamente 1:10 y 10:1, o entre aproximadamente 1:5 y 5:1, o entre aproximadamente 1:3 y 3:1, o entre aproximadamente 1:2 y 2:1, o 10 aproximadamente 1:1. Por ejemplo, el primer esterol es colesterol y el segundo esterol es un derivado del colesterol (por ejemplo, un fitoesteroil). Por ejemplo, la composición comprende un tocoferol (α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol, δ -tocoferol, o una sal o éster del mismo, tal como hemisuccinato de α -tocoferol) y un segundo esterol que es colesterol o un derivado del colesterol o una combinación de los mismos.

En ciertas realizaciones, el derivado de colesterol es β -sitosterol, campesterol, estigmasterol, fucosterol o 15 estigmastanol.

- 15 En ciertos ejemplos, el derivado de colesterol es dihidrocolesterol, ent-colesterol, epi-colesterol, desmosterol, colestanol, colestano, colesteno, colesteril-2'-hidroxietil éter, colesteril-4'-hidroxibutil éter, 3 β -[N-(N'N-dimetilaminoetil)carbamoyl]colesterol (DC-Chol), 24(S)-hidroxicolesiterol, 25-hidroxicolesiterol, 25(R)-27-hidroxicolesiterol, 22-oxacolesiterol, 23-oxacolesiterol, 24-oxacolesiterol, cicloartenol, 22-cetostero, 20-hidroxisterol, 7-hidroxicolesiterol, 19-hidroxicolesiterol, 22-hidroxicolesiterol, 25-hidroxicolesiterol, 7-deshidrocolesterol, 5 α -colest-7-en-3 β -ol, 3,6,9-trioxaoctan-1-ol-colest-3-ol, deshidroergosterol, deshidroepiandrosterona, lanosterol, dihidrolanosterol, lanostenol, lumisterol, sitocalciferol, calcipotriol, coprostanol, colecaciferol, lupeol, ergocalciferol, 22-dihidroergocalciferol, ergosterol, brasicasterol, tomatidina, tomatina, ácido ursólico, ácido cónico, ácido quenodesoxicónico, zimosterol, diosgenina, fucosterol, fecosterol o 25 fecosterol, o una sal o éster del mismo, por ejemplo, colato de sodio.

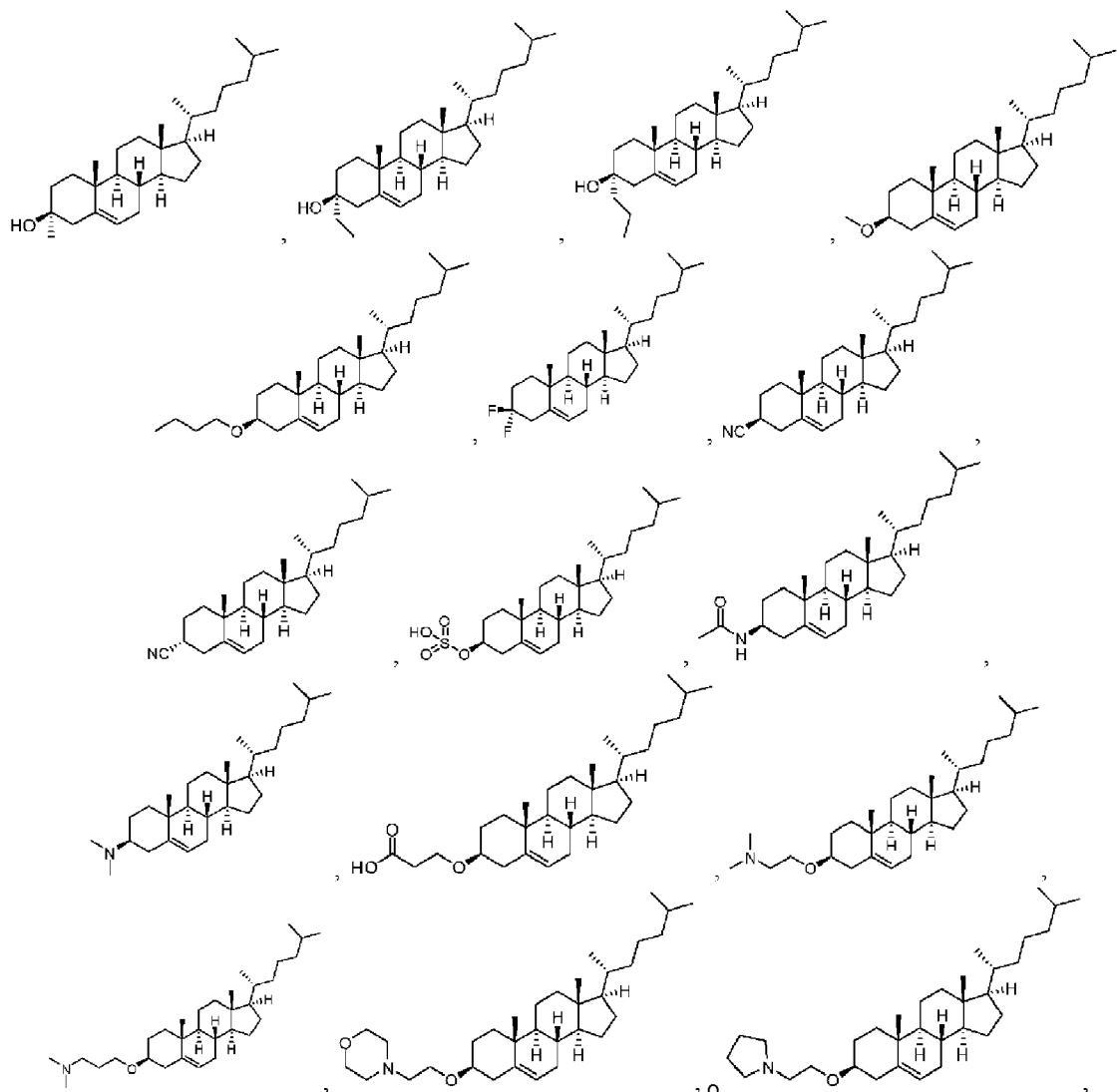
En ciertas realizaciones, el colesterol se refiere al colesterol en sí o una sal o éster del mismo, por ejemplo, 30 ácido succínico de colesterol, sulfato de colesterol, hemisuccinato de colesterol, ftalato de colesterol, fosfato de colesterol, valerato de colesterol, acetato de colesterol, oleato de colesterilo, linoleato de colesterilo, miristato de colesterilo, palmitato de colesterilo, araquidato de colesterilo y fosforilcolina de colesterilo.

En ciertos ejemplos, el derivado de colesterol es un compuesto de cualquiera de las Fórmulas (CD-1) a (CD6):



o una sal o isómero del mismo, en el que _____denota un enlace simple o doble carbono-carbono; R^a es 40 alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido con OH o halo; cada uno de R^b y R^ces independientemente H o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido con OH o halo; cada uno de A₁, B₁, C₁ es independientemente CH, CF, O o S y cuando uno de A₁, B₁, C₁ es O o S, los otros dos son independientemente CH o CF; y cada uno de A₂, B₂, C₂, D₁ es independientemente H, OH o F.

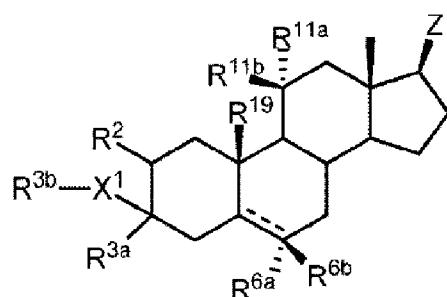
En ciertos ejemplos, el derivado de colesterol es



5

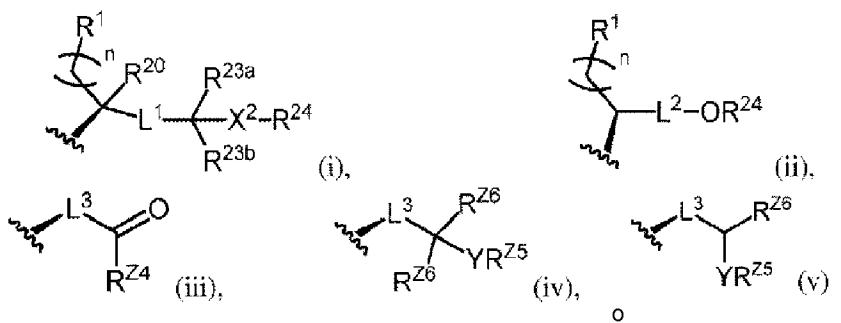
10 o una sal o isómero del mismo.

En ciertos ejemplos, el derivado de colesterol es un compuesto de Fórmula (CD-7):



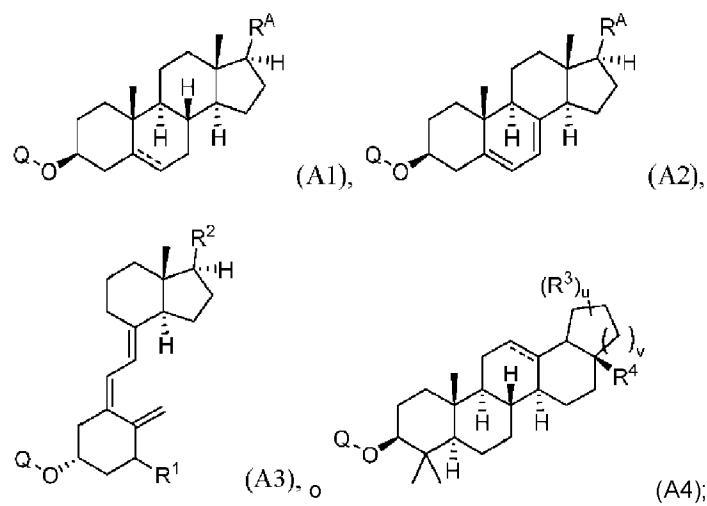
15

(CD-7), o una sal o isómero del mismo, en donde Z es un grupo de la fórmula (i), (ii), (iii), (iv) o (v)



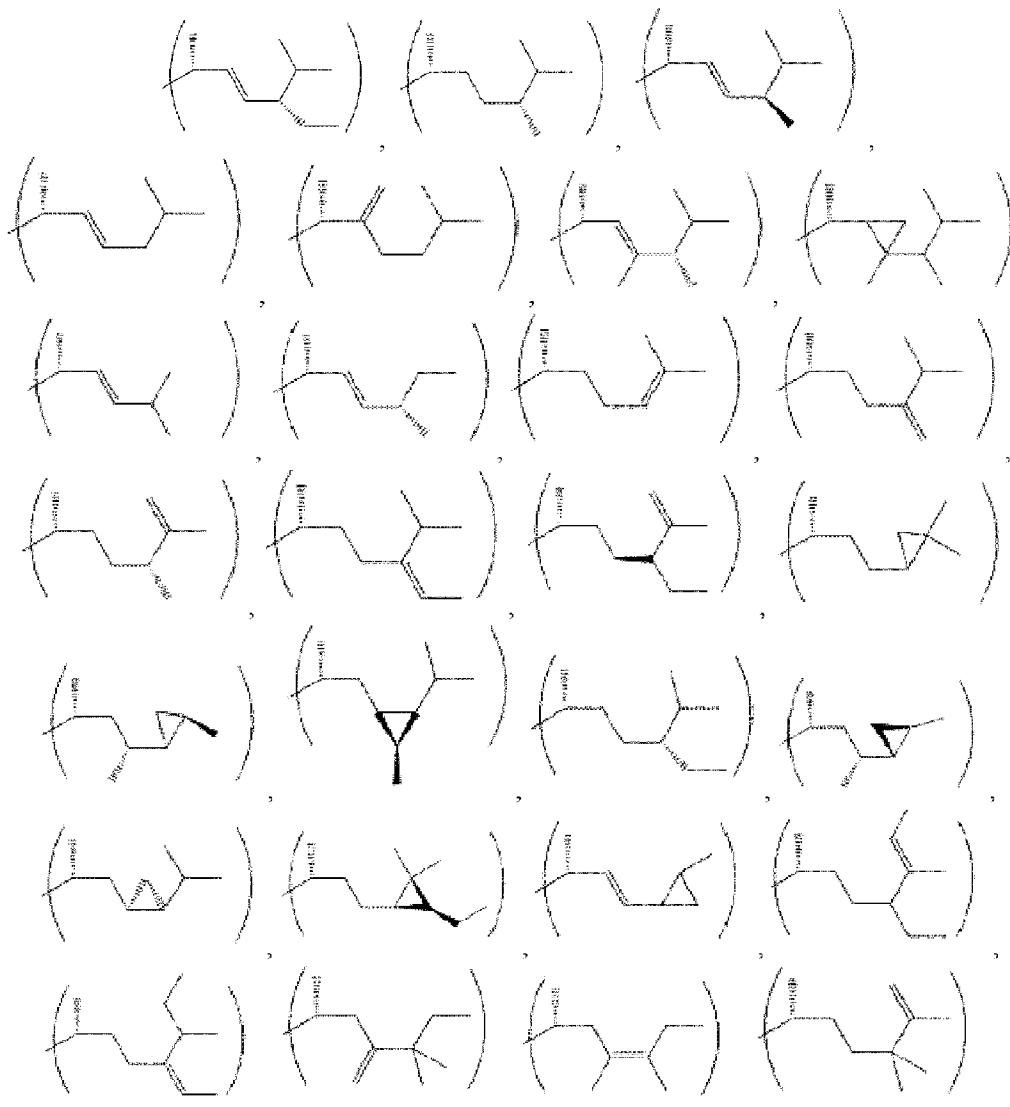
- 5 L^1 y L^2 se seleccionan de un grupo que consiste en un enlace, un alquíleno C₁-C₆ sustituido o no sustituido, un
alquenileno C₂-C₆ sustituido o no sustituido, un alquinileno C₂-C₆ sustituido o no sustituido, un heteroalquíleno
C₁-C₆ sustituido o no sustituido, un heteroalquenileno C₂-C₆ sustituido o no sustituido y un heteroalquinileno
C₂-C₆ sustituido o no sustituido;
- 10 L^3 es un alquíleno C₁-C₆ sustituido o no sustituido, un alquenileno C₂-C₆ sustituido o no sustituido, un
alquinileno C₂-C₆ sustituido o no sustituido, un heteroalquíleno C₁-C₆ sustituido o no sustituido, un
heteroalquenileno C₂-C₆ sustituido o no sustituido, o un heteroalquinileno C₂-C₆ sustituido o no sustituido;
cada caso de X^1 y X^2 es independientemente -O-, -S-, o -NH-;
- 15 R^1 es hidrógeno o alquilo sustituido o no sustituido;
- 20 R^{3b} es hidrógeno;
 R^{3a} es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido, o alquino sustituido o
no sustituido;
cada caso de R^2 , R^{11a} y R^{11b} es independientemente hidrógeno o -OR^{B1}, en donde R^{B1} es hidrógeno o alquilo
sustituido o no sustituido, o R^{11a} y R^{11b} están unidos para formar un grupo oxo (=O);
- 25 cada uno de R^{6a} y R^{6b} es independientemente hidrógeno, halo o alquilo sustituido o no sustituido, y -----
- representa un enlace simple o doble, siempre que si está presente un enlace doble, entonces uno de R^{6a} y
 R^{6b} esté ausente, y siempre que si está presente un enlace simple, entonces el hidrógeno en C5 esté en la
posición alfa o beta;
- 30 cada caso de R^{19} y R^{20} es independientemente hidrógeno o -CH₃;
cada caso de R^{23a} y R^{23b} es independientemente hidrógeno, halógeno o alquilo sustituido o no sustituido, o
 R^{23a} y R^{23b} se unen para formar cicloalquilo C₃-C₆ sustituido o no sustituido;
- 35 R^{24} es hidrógeno o alquilo sustituido o no sustituido;
Y es -O-, -S- o -NR^{Z5}-;
- 40 R^{Z4} es independientemente alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido, alquinilo
sustituido o no sustituido, carbociclico sustituido o no sustituido, heterociclico sustituido o no sustituido, arilo
sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, -OR^{Z5}, -SR^{Z5}, o-N(R^{Z5})₂;
cada aparición de R^{Z5} es independientemente hidrógeno o alquilo opcionalmente sustituido;
- 45 cada caso de R^{Z6} es independientemente hidrógeno o alquilo sustituido o no sustituido, o dos grupos R^{Z6} se
unen para formar un anillo carbocíclico C₃-C₆; y
el subíndice n es 0 o 1.
- 50 Otros ejemplos de derivados del colesterol se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. N.^o
4,125,544 y WO2013/036835.

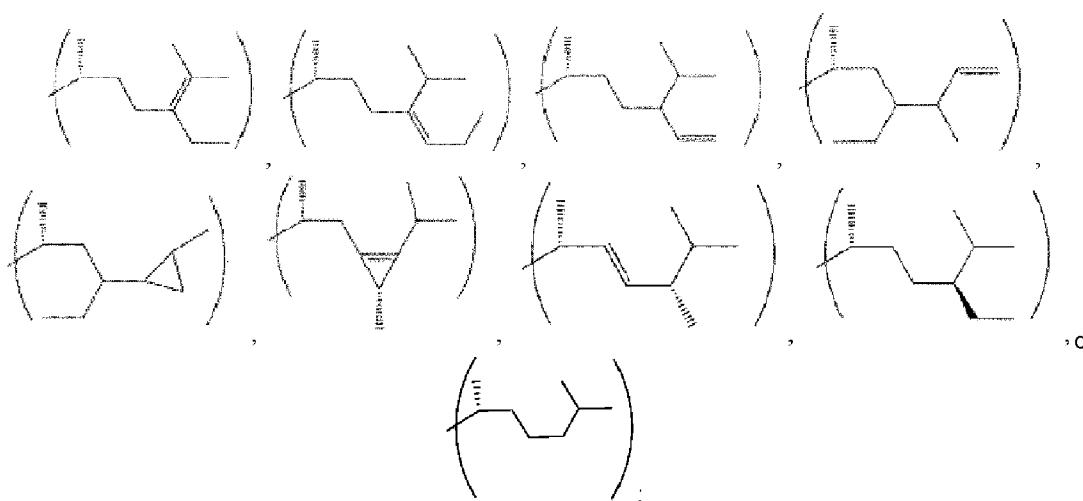
En otros ejemplos más, el derivado de colesterol es de cualquiera de las Fórmulas (A1)-(A4):



5 o una sal o isómero del mismo, en donde ----- denota un enlace simple o doble carbono-carbono;

R^A es



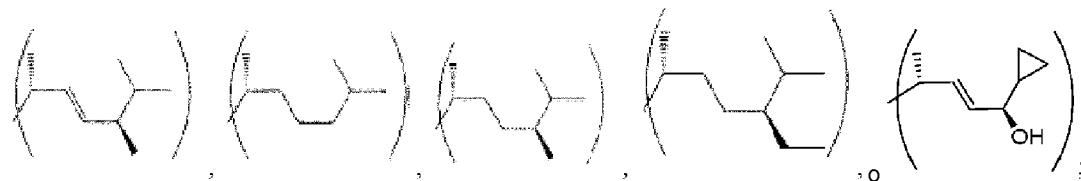


5 u es 1 o 2;

v es 1 o 2;

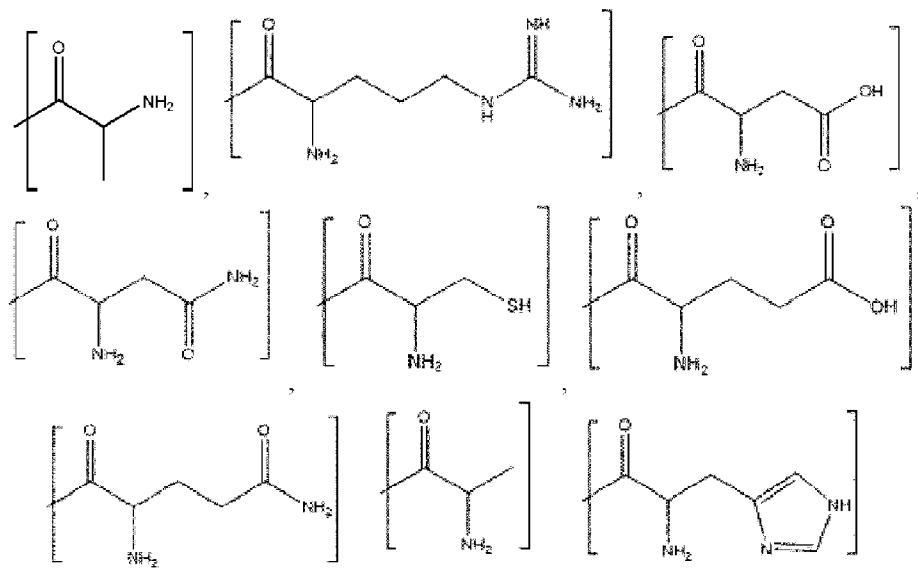
R¹ es H o OH;

10

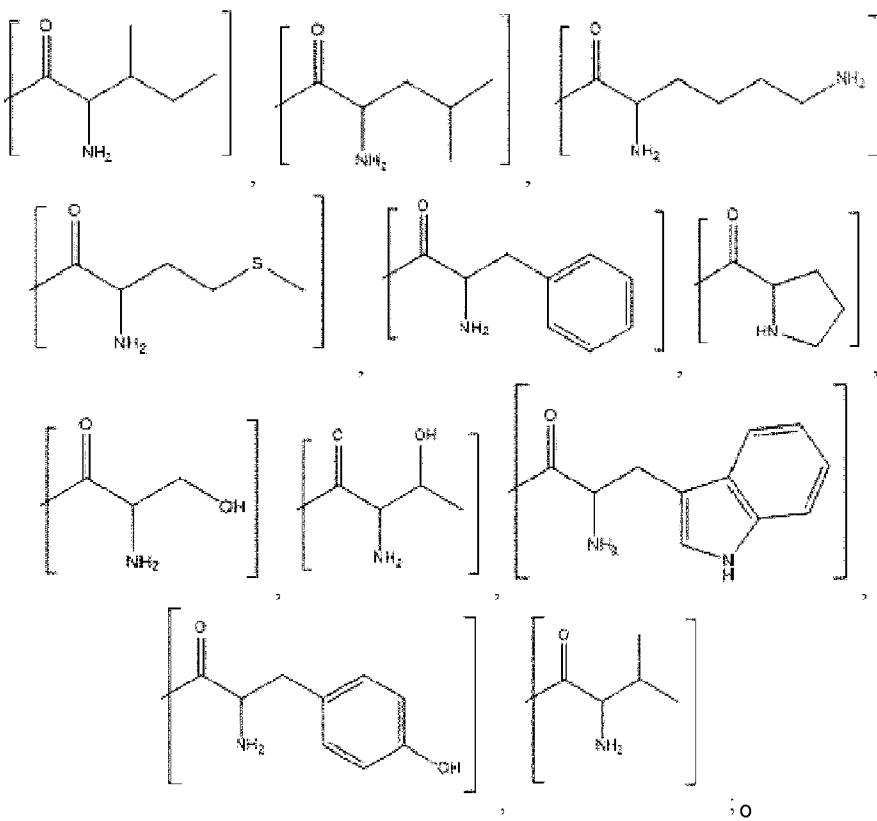
R² es15 cada R₃ es independientemente CH₃, oR⁴ es CH₃, CH₂OH o CO₂H; y

20

Q es H,

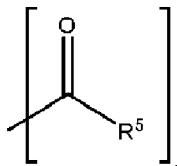


25

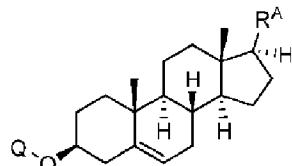


5

Q es

10 donde R⁵ es alquilo C₁₋₂₅, alquenilo C₂₋₂₅, alquinilo C₂₋₂₅ o glicósido.

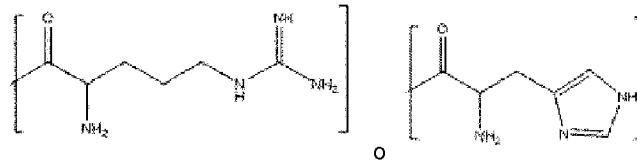
En algunos ejemplos, cuando el derivado de colesterol tiene una fórmula



15

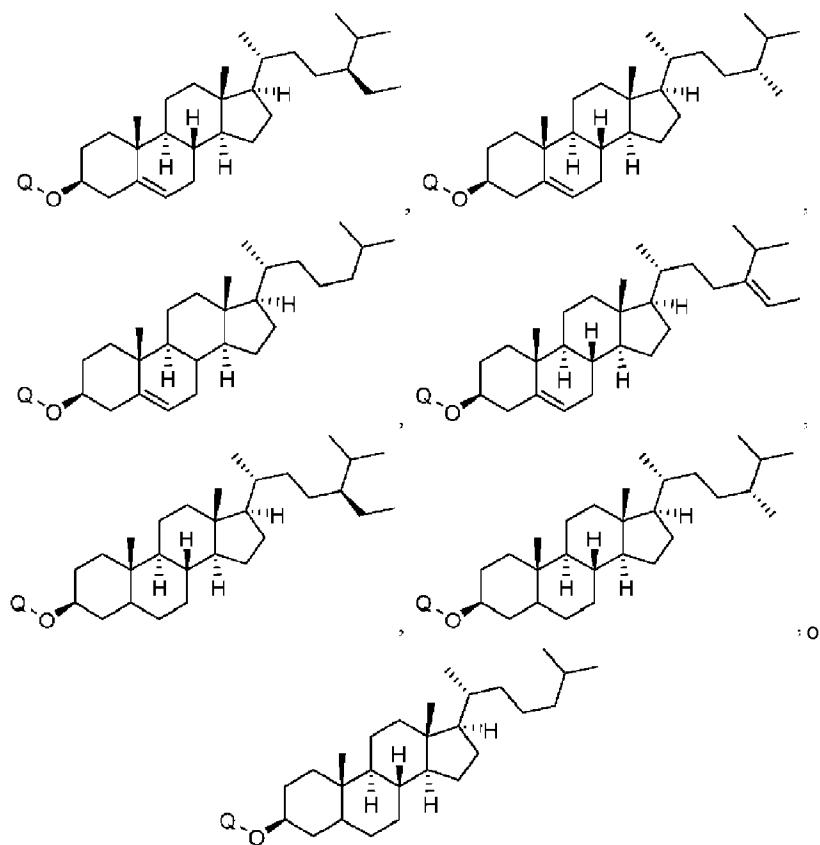
entonces Q no es H.

Por ejemplo, Q es



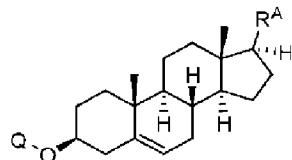
20

Por ejemplo, el derivado de colesterol tiene una fórmula:

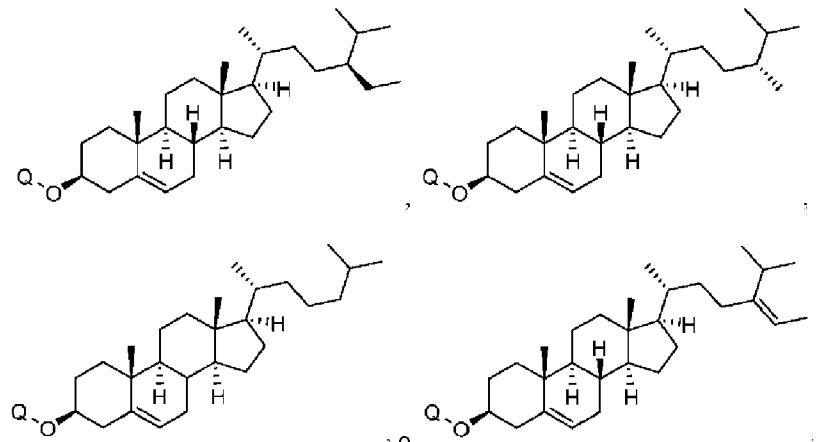


5

Por ejemplo, el derivado de colesterol tiene una fórmula:

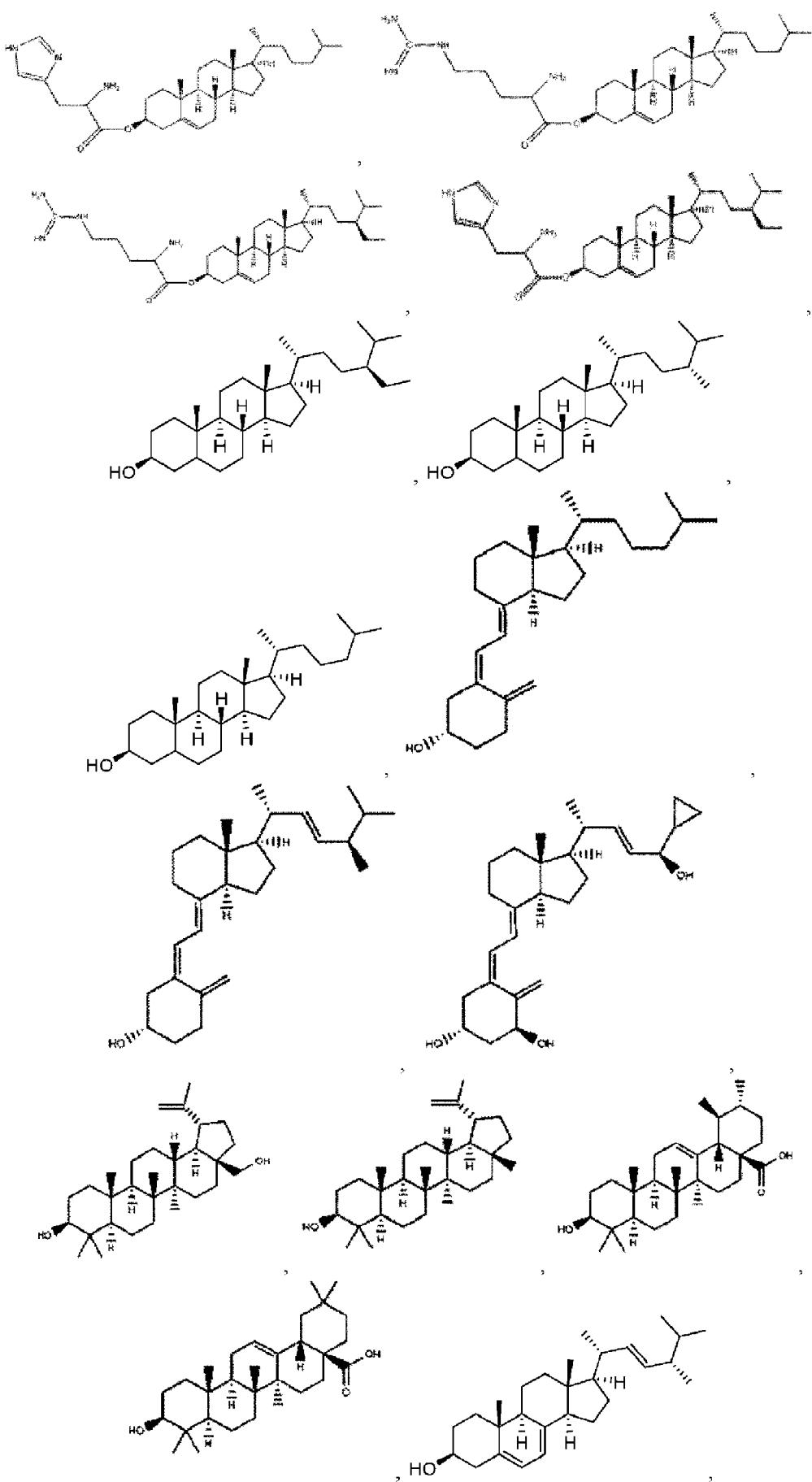


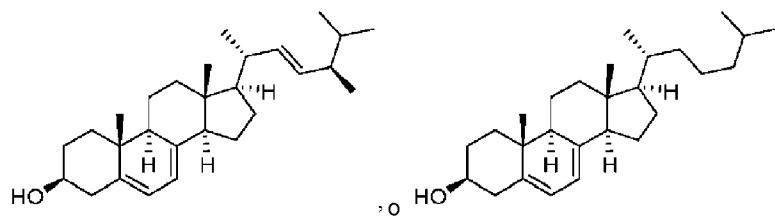
10 Por ejemplo, el derivado de colesterol tiene una fórmula:



15

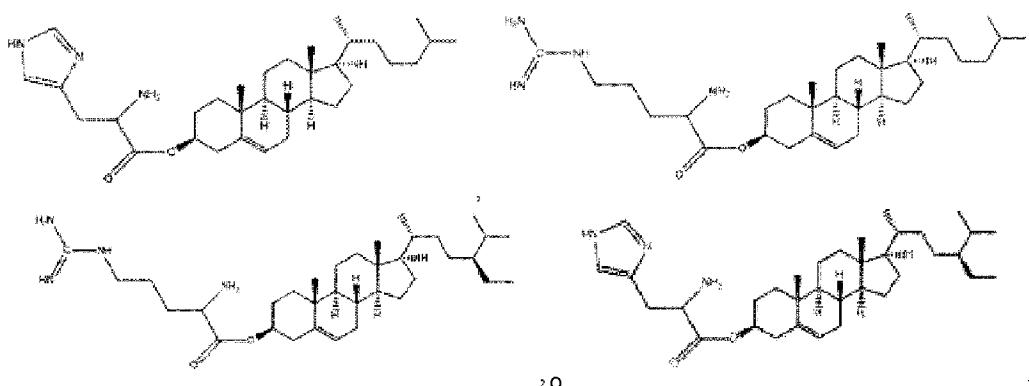
Por ejemplo, el derivado de colesterol tiene una fórmula de cualquiera de las siguientes:





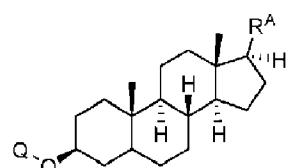
Por ejemplo, el derivado de colesterol tiene una fórmula:

5



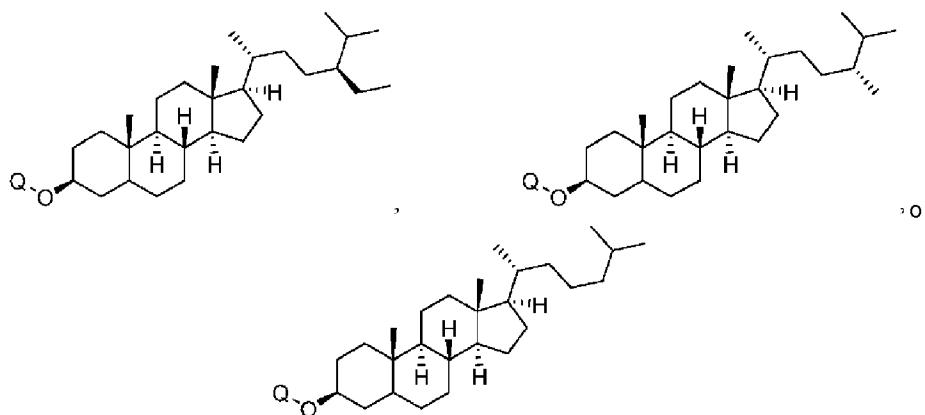
Por ejemplo, el derivado de colesterol tiene una fórmula:

10



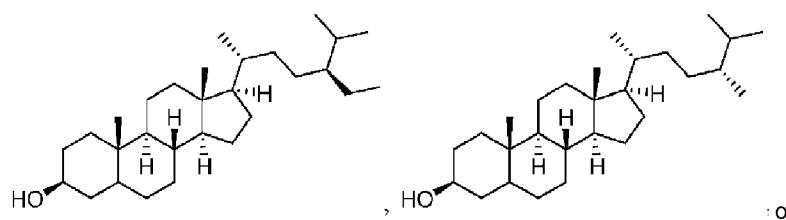
Por ejemplo, el derivado de colesterol tiene una fórmula:

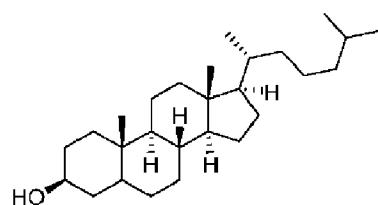
15



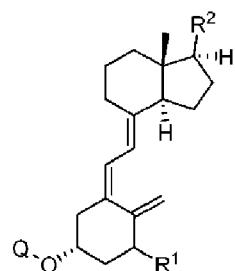
Por ejemplo, el derivado de colesterol tiene una fórmula:

20



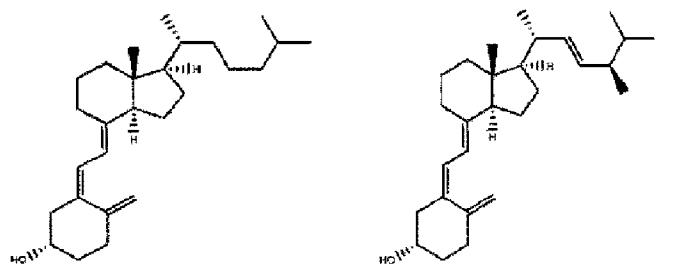


Por ejemplo, el derivado de colesterol tiene una fórmula:

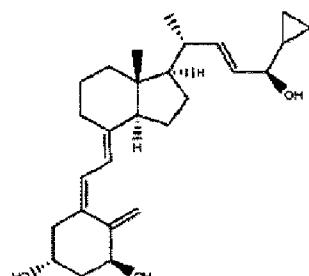


5

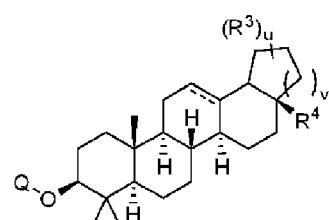
Por ejemplo, el derivado de colesterol tiene una fórmula:



10

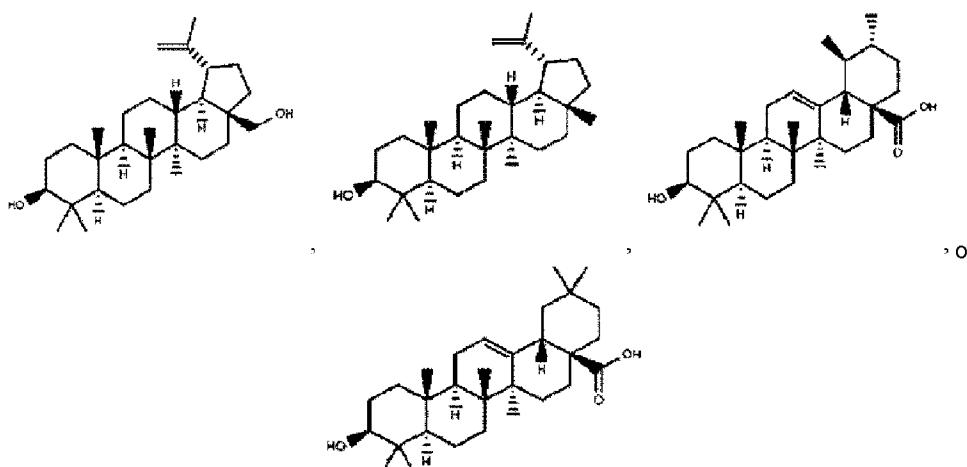


Por ejemplo, el derivado de colesterol tiene una fórmula:



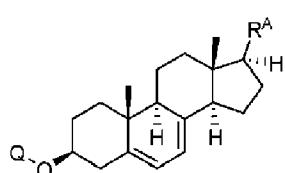
15

Por ejemplo, el derivado de colesterol tiene una fórmula:



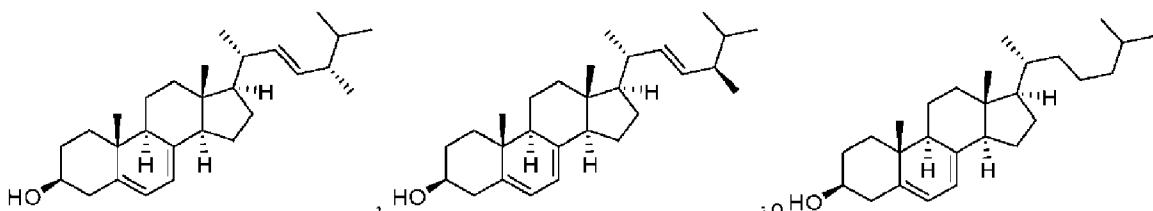
5

Por ejemplo, el derivado de colesterol tiene una fórmula:



10

Por ejemplo, el derivado de colesterol tiene una fórmula:



15

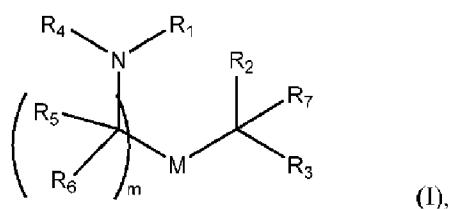
Lípidos ionizables

La presente divulgación proporciona lípidos ionizables que incluyen un resto de amina central y al menos un grupo biodegradable. Los lípidos descritos en el presente documento pueden utilizarse ventajosamente en 20 composiciones de nanopartículas lipídicas para la administración de fármacos terapéuticos y/o profilácticos a células u órganos de mamíferos. Por ejemplo, los lípidos descritos en el presente documento tienen poca o ninguna inmunogenicidad. Por ejemplo, el compuesto lipídico de cualquiera de las fórmulas (I), (IA), (IB), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe), (IIf) o (IIg) tiene una inmunogenicidad menor en comparación con un lípido de referencia (*por ejemplo*, MC3, KC2 o DLinDMA). Por ejemplo, una formulación que comprende un lípido divulgado en el presente documento y un agente terapéutico o profiláctico tiene un índice terapéutico aumentado en comparación con una formulación correspondiente que comprende un lípido de referencia (*por ejemplo*, MC3, KC2 o DLinDMA) y el mismo agente terapéutico o profiláctico.

25

En un primer aspecto de la invención, los compuestos descritos en el presente documento son de Fórmula (I):

30



o sus N-óxidos, o sales o isómeros de los mismos, en donde:

R₁ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₅₋₃₀, alquenilo C₅₋₂₀, -R*YR'', -YR'', y -R"MR';

5 R₂ y R₃ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C₁₋₁₄, alquenilo C₂₋₁₄, -R*YR'', -YR'' y -R"OR" o R₂ y R₃, junto con el átomo al que están unidos, forman un heterociclo o carbociclo;

10 R⁴ se selecciona del grupo formado por hidrógeno, un carbociclo C₃₋₆, -(CH₂)_nQ, -(CH₂)_nCHQR, -CHQR, -CQ(R)₂, y alquilo C₁₋₆ no sustituido, donde Q se selecciona de un carbociclo, heterociclo, -OR, -O(CH₂)_nN(R)₂, -C(O)OR, -OC(O)R, -CX₃, -CX₂H, -CN, -N(R)₂, -C(O)N(R)₂, -N(R)C(O)R, -N(R)S(O)₂R, -N(R)C(O)N(R)₂, -N(R)C(S)N(R)₂, -N(R)R₈, -N(R)S(O)ZR_s, -O(CH₂)_nOF, -N(R)C(=NR₉)N(R)₂, -N(R)C(=CHR₉)N(R)₂, -OC(O)N(R)₂, -N(R)C(O)OR, -N(OR)C(O)R, -N(OR)S(O)₂R, -N(OR)C(O)OR, -N(OR)C(O)N(R)₂, -N(OR)C(S)N(R)₂, -N(OR)C(=NR₉)N(R)₂, -N(OR)C(=CHR₉)N(R)₂, -C(=NR₉)N(R)₂, -C(=NR₉)R, -C(O)N(R)OR, y -C(R)N(R)₂C(O)OR, y cada n se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4 y 5;

15 cada R₅ se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C₁₋₃, alquenilo C₂₋₃, y H;

cada R₆ se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C₁₋₃, alquenilo C₂₋₃, y H;

20 M y M' se seleccionan independientemente entre -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)-M"-C(O)O-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(S)S-, -SC(S)-, -CH(OH)-, -P(O)(OR')O-, -S(O)₂-, -S-S-, un grupo arilo y un grupo heteroarilo, en el que M" es un enlace, un alquilo C₁₋₁₃ o un alquenilo C₂₋₁₃;

R₇ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁₋₃, alquenilo C₂₋₃, y H;

25 R₈ se selecciona del grupo que consiste en carbociclo y heterociclo C₃₋₆;

R₉ se selecciona del grupo que consiste en H, CN, NO₂, alquilo C₁₋₆, -OR, -S(O)₂R, -S(O)₂N(R)₂, alquenilo C₂₋₆, carbociclo C₃₋₆ y heterociclo; cada R se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C₁₋₃, alquenilo C₂₋₃, y H;

30 cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C₁₋₁₈, alquenilo C₂₋₁₈, -R*YR'', -YR'', y H;

cada R'' se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C₃₋₁₅ y alquenilo C₃₋₁₅;

35 cada R* se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C₁₋₁₂ y alquenilo C₂₋₁₂;

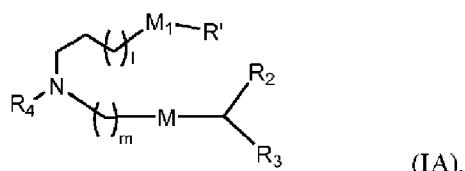
cada Y es independientemente un carbociclo C₃₋₆;

40 cada X se selecciona independientemente del grupo que consiste en F, Cl, Br y I;

m se selecciona de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13; y en donde cuando R⁴

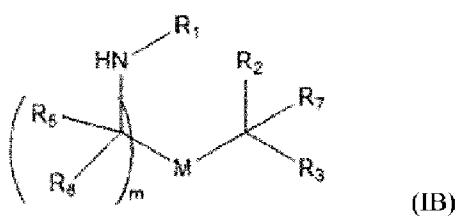
45 es -(CH₂)_nQ, -(CH₂)_nCHQR, -CHQR, o -CQ(R)₂, entonces (i) Q no es -N(R)₂ cuando n es 1, 2, 3, 4 o 5, o (ii) Q no es heterocicloalquilo de 5, 6 o 7 miembros cuando n es 1 o 2.

En ciertas realizaciones, un subconjunto de compuestos de Fórmula (I) incluye aquellos de Fórmula (IA):



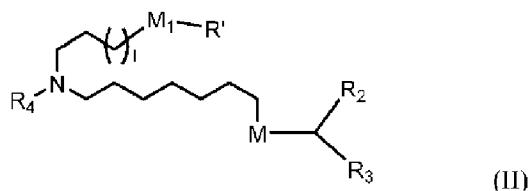
50 o su N-óxido, o una sal o isómero del mismo, en donde I se selecciona de 1, 2, 3, 4 y 5; m se selecciona de 5, 6, 7, 8 y 9; M₁ es un enlace o M'; R⁴ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ no sustituido, o -(CH₂)_nQ, en donde Q es OH, -NHC(S)N(R)₂, -NHC(O)N(R)₂, -N(R)C(O)R, -N(R)S(O)₂R, -N(R)R₈, -N(R)S(O)₂R₈, -NHC(=NR₉)N(R)₂, -NHC(=CHR₉)N(R)₂, -OC(O)N(R)₂, -N(R)C(O)OR, heteroarilo o heterocicloalquilo; M y M' se seleccionan independientemente de -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)-M"-C(O)O-, -C(O)N(R')-, -P(O)(OR')O-, -S-S-, un grupo arilo y un grupo heteroarilo; y R₂ y R₃ se seleccionan independientemente del grupo formado por H, alquilo C₁₋₁₄ y alquenilo C₂₋₁₄. Por ejemplo, m es 5, 7 o 9. Por ejemplo, Q es OH, -NHC(S)N(R)₂ o -NHC(O)N(R)₂. Por ejemplo, Q es -N(R)C(O)R o -N(R)S(O)₂R.

60 En ciertas realizaciones, un subconjunto de compuestos de Fórmula (I) incluye los de Fórmula (IB):



- o su N-óxido, o una sal o isómero de los mismos, en los que todas las variables son como se definen en el presente documento. Por ejemplo, m se selecciona de 5, 6, 7, 8, y 9; R⁴ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ no sustituido, o -(CH₂)_nQ, en el que Q es OH, -NHC(S)N(R)₂, -NHC(O)N(R)₂, -N(R)C(O)R, -N(R)S(O)₂R, -N(R)R₈, -N(R)S(O)₂R₈, -NHC(=NR₉)N(R)₂, -NHC(=CHR₉)N(R)₂, -OC(O)N(R)₂, -N(R)C(O)OR, heteroarilo o heterocicloalquilo; M y M' se seleccionan independientemente de -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)-M"-C(O)O-, -C(O)N(R')-, -P(O)(OR')O-, -S-S-, un grupo arilo y un grupo heteroarilo; y R₂ y R₃ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C₁₋₁₄, y alquenilo C₂₋₁₄. Por ejemplo, m es 5, 7 o 9. Por ejemplo, Q es OH, -NHC(S)N(R)₂ o -NHC(O)N(R)₂. Por ejemplo, Q es -N(R)C(O)R o -N(R)S(O)₂R.

En ciertas realizaciones, un subconjunto de compuestos de Fórmula (I) incluye aquellos de Fórmula (II):



- o su N-óxido, o una sal o isómero del mismo, donde l se selecciona de 1, 2, 3, 4 y 5; M₁ es un enlace o M'; R₄ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ no sustituido, o -(CH₂)_nQ, en el que n es 2, 3, o 4, y Q es OH, -NHC(S)N(R)₂, -NHC(O)N(R)₂, -N(R)C(O)R, -N(R)S(O)₂R, -N(R)R₈, -N(R)S(O)₂R₈, -NHC(=NR₉)N(R)₂, -NHC(=CHR₉)N(R)₂, -OC(O)N(R)₂, -N(R)C(O)OR, heteroarilo o heterocicloalquilo; M y M' se seleccionan independientemente de -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)-M"-C(O)O-, -C(O)N(R')-, -P(O)(OR')O-, -S-S-, un grupo arilo y un grupo heteroarilo; y R₂ y R₃ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C₁₋₁₄, y alquenilo C₂₋₁₄.

Los compuestos de cualquiera de las fórmulas (I) o (IA) incluyen una o más de las siguientes características cuando son aplicables.

- En algunas realizaciones, M₁ es M'.
- En algunas realizaciones, M y M' son independientemente -C(O)O- u -OC(O)-.
- En algunas realizaciones, al menos uno de M y M' es -C(O)O- o -OC(O)-.
- En algunas realizaciones, al menos uno de M y M' es -OC(O)-M"-C(O)O-.
- En algunas realizaciones, al menos uno de M y M' es -OC(O)-.
- En ciertas realizaciones, M es -OC(O)- y M' es -C(O)O-. En algunas realizaciones, M es -C(O)O- y M' es -OC(O)-. En ciertas realizaciones, M y M' son cada uno -OC(O)-. En algunas realizaciones, M y M' son cada uno -C(O)O-.

- En algunas realizaciones, M y M' son independientemente -S-S-.
- En algunas realizaciones, al menos uno de M y M' es -S-S-.
- En algunas realizaciones, uno de M y M' es -C(O)O- o -OC(O)- y el otro es -S-S-. Por ejemplo, M es -C(O)O- o -OC(O)- y M' es -S-S- o M' es -C(O)O- o -OC(O)- y M es -S-S-.

- En algunas realizaciones, l es 1, 3 o 5.
- En algunas realizaciones, R₄ es hidrógeno.
- En algunas realizaciones, R₄ no es hidrógeno.
- En algunas realizaciones, R₄ es metilo no sustituido o -(CH₂)_nQ, en el que Q es OH, -NHC(S)N(R)₂, -

NHC(O)N(R)₂, -N(R)C(O)R o -N(R)S(O)₂R.

En algunas realizaciones, Q es OH.

5 En algunas realizaciones, Q es -NHC(S)N(R)₂.

En algunas realizaciones, Q es -NHC(O)N(R)₂.

En algunas realizaciones, Q es -N(R)C(O)R.

10 En algunas realizaciones, Q es -N(R)S(O)₂R.

En algunas realizaciones, Q es -O(CH₂)_nN(R)₂.

15 En algunas realizaciones, Q es -O(CH₂)_nOR.

En algunas realizaciones, Q es -N(R)Rs.

En algunas realizaciones, Q es -N(R)S(O)₂R₈.

20 En algunas realizaciones, Q es -NHC(=NR₉)N(R)₂.

En algunas realizaciones, Q es -NHC(=CHR₉)N(R)₂.

25 En algunas realizaciones, Q es -OC(O)N(R)₂.

En algunas realizaciones, Q es -N(R)C(O)OR.

En algunas realizaciones, n es 2.

30 En algunas realizaciones, n es 3.

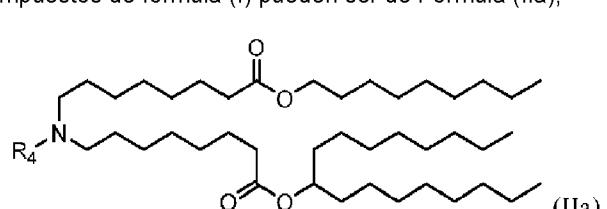
En algunas realizaciones, n es 4.

35 En algunas realizaciones, M₁ está ausente.

En algunas realizaciones, R' es alquilo C₁₋₁₈, alquenilo C₂₋₁₈, -R*YR", o -YR".

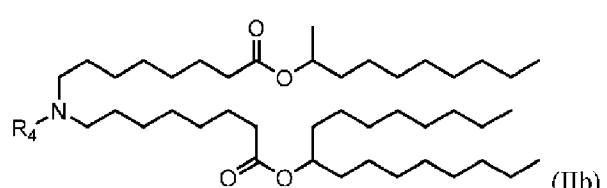
En algunas realizaciones, R₂ y R₃ son independientemente alquilo C₃₋₁₄ o alquenilo C₃₋₁₄.

40 En una realización, los compuestos de fórmula (I) pueden ser de Fórmula (IIa),



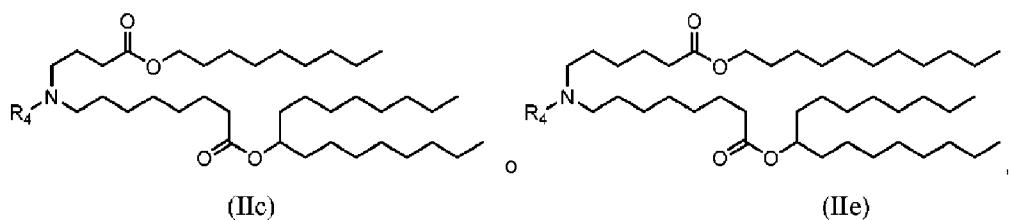
45 o sus N-óxidos, o sales o isómeros de los mismos, en donde R₄ es como se describe en el presente documento.

En otra realización, los compuestos de fórmula (I) pueden ser de Fórmula (IIb),



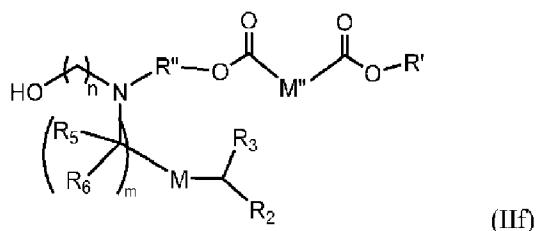
50 o sus N-óxidos, o sales o isómeros de los mismos, en donde R₄ es como se describe en el presente documento.

En otra realización, los compuestos de fórmula (I) pueden ser de Fórmula (IIc) o (IId):



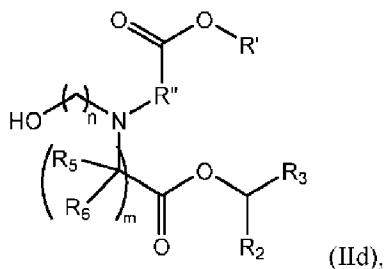
o sus N-óxidos, o sales o isómeros de los mismos, en donde R₄ es como se describe en el presente documento.

- 5 En otra realización, los compuestos de fórmula (I) pueden ser de fórmula (IIf):



o sus N-óxidos, o sales o isómeros de los mismos, en donde M es $-C(O)O-$ o $-OC(O)-$, M" es alquilo C₁₋₆ (por ejemplo, alquilo C₁₋₄) o alquenilo C₂₋₆ (por ejemplo, alquenilo C₂₋₄), R₂ y R₃ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo C₅₋₁₄ y alquenilo C₅₋₁₄, y n se selecciona de 2, 3 y 4.

En una realización adicional, los compuestos de Fórmula (I) pueden ser de fórmula (IId),

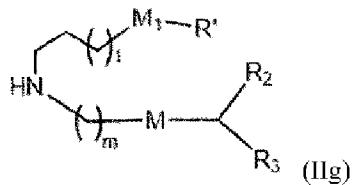


- 15

o sus N-óxidos, o sales o isómeros de los mismos, en donde n es 2, 3 o 4; y m, R¹, R², y R₂ a R₆ son como se describen en el presente documento. Por ejemplo, cada uno de R₂ y R₃ pueden seleccionarse independientemente del grupo que consiste en alquilo C₅₋₁₄ y alquenilo C₅₋₁₄.

- 20

En otra realización, los compuestos de Fórmula (I) pueden ser de fórmula (IIg),



- 25 o sus N-óxidos, o sales o isómeros de los mismos, en donde I se selecciona de 1, 2, 3, 4 y 5; m se selecciona de 5, 6, 7, 8 y 9; M₁ es un enlace o M'; M y M' se seleccionan independientemente de -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)-M"-C(O)O-, -C(O)N(R')-, -P(O)(OR')O-, -S-S-, un grupo arilo y un grupo heteroarilo; y R₂ y R₃ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C₁₋₁₄ y alquenilo C₂₋₁₄. Por ejemplo, M" es alquilo C₁₋₆ (por ejemplo, alquilo C₁₋₄) o alquenilo C₂₋₆(por ejemplo, alquenilo C₂₋₄). Por ejemplo, R₂ y R₃ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo C₅₋₁₄ y alquenilo C₅₋₁₄.

30

Los compuestos de una cualquiera de las fórmulas (I), (IA), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe), y (IIf) incluyen una o más de las siguientes características cuando sea aplicable.

- 35 En algunas realizaciones, R₄ se selecciona del grupo que consiste en un carbocírculo C₃₋₆, -(CH₂)_nQ, -(CH₂)_nCHQR, -CHQR, y -CQ(R)₂, donde Q se selecciona de un carbocírculo C₃₋₆, heterocírculo aromático o no aromático de 5 a 14 miembros que tiene uno o más heteroátomos seleccionados de N, O, S, y P, -OR, -

$O(CH_2)_nN(R)_2$, $-C(O)OR$, $-OC(O)R$, $-CX_3$, $-CX_2H$, $-CXH_2$, $-CN$, $-N(R)_2$, $-C(O)N(R)_2$, $-N(R)C(O)R$, $-N(R)S(O)_2R$, $-N(R)C(O)N(R)_2$, $-N(R)S(O)_2R_8$, $-N(R)C(S)N(R)_2$, y $-C(R)N(R)_2C(O)OR$, y cada n se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4 y 5.

- 5 En otra realización, R_4 se selecciona del grupo que consiste en un carbociclo C_{3-6} , $-(CH_2)_nQ$, $-(CH_2)_nCHQR$, $-CHQR$, y $-CQ(R)_2$, donde Q se selecciona de un carbociclo C_{3-6} , un heteroarilo de 5 a 14 miembros que tiene uno o más heteroátomos seleccionados entre N, O y S, -OR, $-O(CH_2)_nN(R)_2$, $-C(O)OR$, $-OC(O)R$, $-CX_3$, $-CX_2H$, $-CXH_2$, $-CN$, $-C(O)N(R)_2$, $-N(R)C(O)R$, $-N(R)S(O)_2R$, $-N(R)S(O)_2R_8$, $-N(R)C(O)N(R)_2$, $-N(R)C(S)N(R)_2$, $-C(R)N(R)_2C(O)OR$, y un heterocicloalquilo de 5 a 14 miembros que tiene uno o más heteroátomos seleccionados entre N, O y S que está sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre oxo (=O), OH, amino y alquilo C_{1-3} , y cada n se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4 y 5.
- 10 En otra realización, R_4 se selecciona del grupo que consiste en un carbociclo C_{3-6} , $-(CH_2)_nQ$, $-(CH_2)_nCHQR$, $-CHQR$, y $-CQ(R)_2$, donde Q se selecciona de un carbociclo C_{3-6} , un heterociclo de 5 a 14 miembros que tiene uno o más heteroátomos seleccionados entre N, O y S, -OR, $-O(CH_2)_nN(R)_2$, $-C(O)OR$, $-OC(O)R$, $-CX_3$, $-CX_2H$, $15 -CXH_2$, $-CN$, $-C(O)N(R)_2$, $-N(R)C(O)R$, $-N(R)S(O)_2R$, $-N(R)S(O)_2R_8$, $-N(R)C(O)N(R)_2$, $-N(R)C(S)N(R)_2$, $-C(R)N(R)_2C(O)OR$, y cada n se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4 y 5; y cuando Q es un heterociclo de 5 a 14 miembros y (i) R_4 es $-(CH_2)_nQ$ en el que n es 1 o 2, o (ii) R_4 es $-(CH_2)_nCHQR$ en el que n es 1, o (iii) R_4 es $-CHQR$, y $-CQ(R)_2$, entonces Q es un heteroarilo de 5 a 14 miembros o un heterocicloalquilo de 8 a 14 miembros.
- 20 En otra realización, R_4 se selecciona del grupo que consiste en un carbociclo C_{3-6} , $-(CH_2)_nQ$, $-(CH_2)_nCHQR$, $-CHQR$, y $-CQ(R)_2$, donde Q se selecciona de un carbociclo C_{3-6} , un heteroarilo de 5 a 14 miembros que tiene uno o más heteroátomos seleccionados entre N, O y S, -OR, $-O(CH_2)_nN(R)_2$, $-C(O)OR$, $-OC(O)R$, $-CX_3$, $-CX_2H$, $-CXH_2$, $-CN$, $-C(O)N(R)_2$, $-N(R)C(O)R$, $-N(R)S(O)_2R$, $-N(R)S(O)_2R_8$, $-N(R)C(O)N(R)_2$, $-N(R)C(S)N(R)_2$, $25 -C(R)N(R)_2C(O)OR$, y cada n se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4 y 5.

- 25 En otra realización, R_4 es $-(CH_2)_nQ$, donde Q es $-N(R)S(O)_2R_8$ y n se selecciona de 1, 2, 3, 4 y 5. En una realización adicional, R_4 es $-(CH_2)_nQ$, donde Q es $-N(R)S(O)_2R_8$, en el que R_8 es un carbociclo C_{3-6} tal como cicloalquilo C_{3-6} , y n se selecciona de 1, 2, 3, 4 y 5. Por ejemplo, R_4 es $-(CH_2)_3NHS(O)_2R_8$ y R_8 es ciclopropilo. En otra realización, R_4 es alquilo C_{1-4} no sustituido, por ejemplo, metilo no sustituido.

- 30 En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona un compuesto que tiene la Fórmula (I), en donde R_4 es $-(CH_2)_nQ$ o $-(CH_2)_nCHQR$, donde Q es $-N(R)_2$, y n se selecciona de 3, 4, y 5.

- 35 En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona un compuesto que tiene la Fórmula (I), en donde R_4 se selecciona del grupo que consiste en $-(CH_2)_nQ$, $-(CH_2)_nCHQR$, $-CHQR$, y $-CQ(R)_2$, donde Q es $-N(R)_2$, y n se selecciona de 1, 2, 3, 4, y 5.

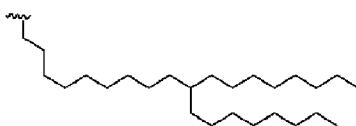
- 40 En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona un compuesto que tiene la Fórmula (I), en donde R_2 y R_3 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo C_{2-14} , alquenilo C_{2-14} , $-R^*YR"$, $-YR"$, y $-R^*OR"$, o R_2 y R_3 , junto con el átomo al que están unidos, forman un heterociclo o carbociclo, y R_4 es $-(CH_2)_nQ$ o $-(CH_2)_nCHQR$, donde Q es $-N(R)_2$, y n se selecciona de 3, 4, y 5.

- 45 En ciertas realizaciones, R_2 y R_3 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo C_{2-14} , alquenilo C_{2-14} , $-R^*YR"$, $-YR"$, y $-R^*OR"$, o R_2 y R_3 , junto con el átomo al que están unidos, forman un heterociclo o carbociclo.

- 50 En algunas realizaciones, R_1 se selecciona del grupo que consiste en alquilo C_{5-20} y alquenilo C_{5-20} . En otras realizaciones, R_1 se selecciona del grupo que consiste en $-R^*YR"$, $-YR"$, y $-R^*M'R'$.

- 55 En ciertas realizaciones, R_1 se selecciona de $-R^*YR"$ y $-YR"$. En algunas realizaciones, Y es un grupo ciclopropilo. En algunas realizaciones, R^* es alquilo C_8 o alquenilo C_8 . En ciertas realizaciones, $R"$ es alquilo C_{3-12} . Por ejemplo, $R"$ puede ser alquilo C_3 . Por ejemplo, $R"$ puede ser alquilo C_{4-8} (por ejemplo, alquilo C_4 , C_5 , C_6 , C_7 , o C_8). En algunas realizaciones, R_1 es alquilo C_{5-20} . En algunas realizaciones, R_1 es alquilo C_6 . En algunas realizaciones, R_1 es alquilo C_8 . En otras realizaciones, R_1 es alquilo C_9 . En ciertas realizaciones, R_1 es alquilo C_{14} . En otras realizaciones, R_1 es alquilo C_{18} .

- 60 En algunas realizaciones, R_1 es alquilo C_{21-30} . En algunas realizaciones, R_1 es alquilo C_{26} . En algunas realizaciones, R_1 es alquilo C_{28} . En ciertas realizaciones, R_1 es

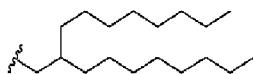


En algunas realizaciones, R₁ es alquenilo C₅₋₂₀. En ciertas realizaciones, R₁ es alquenilo C₁₈. En algunas realizaciones, R₁ es linoleilo.

5

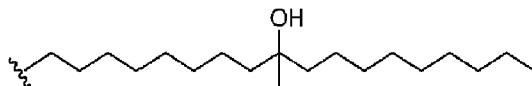
En ciertas realizaciones, R₁ está ramificado (*por ejemplo*, decan-2-ilo, undecan-3-ilo, dodecan-4-ilo, tridecan-5-ilo, tetradecan-6-ilo, 2-metilundecan-3-ilo, 2-metildodecan-2-ilo, 3-metilundecan-3-ilo, 4-metildodecan-4-ilo, o heptadeca-9-ilo). En ciertas realizaciones, R₁ es

10



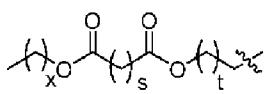
En ciertas realizaciones, R₁ es alquilo C₅₋₂₀ o alquenilo C₅₋₂₀ no sustituido. En ciertas realizaciones, R' es alquilo C₅₋₂₀ sustituido o alquenilo C₅₋₂₀ (*por ejemplo*, sustituido con un carbociclo C₃₋₆ tal como el 1-ciclopropilnonio o sustituido con OH o alcoxi). Por ejemplo, R₁ es

15



En otras realizaciones, R₁ es -R''M'R'. En ciertas realizaciones, M' es -OC(O)-M''-C(O)O-. Por ejemplo, R₁ es

20



en donde x es un número entero entre 1 y 13 (por ejemplo, seleccionado de 3, 4, 5 y 6), s es un número entero entre 1 y 13 (por ejemplo, seleccionado de 1, 2 y 3), y t es un número entero de 2 y 14 (por ejemplo, seleccionado de 4, 5 y 6). Por ejemplo, x se selecciona de 3, 4, 5 y 6, s se selecciona de 1, 2 y 3, y t se selecciona de 4, 5 y 6.

En otras realizaciones, R₁ es diferente de -(CHR₅R₆)_m-M-CR₂R₃R₇.

25

En algunas realizaciones, R' se selecciona de -R''YR'' y -YR''. En algunas realizaciones, Y es cicloalquilo C₃₋₈. En algunas realizaciones, Y es arilo C₆₋₁₀. En algunas realizaciones, Y es un grupo ciclopropilo. En algunas realizaciones, Y es un grupo ciclohexilo. En ciertas realizaciones, R'' es alquilo C₁.

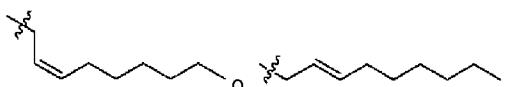
35

En algunas realizaciones, R'' se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₃₋₁₂ y alquenilo C₃₋₁₂. En algunas realizaciones, R'' adyacente a Y es alquilo C₁. En algunas realizaciones, R'' adyacente a Y es alquilo C₄₋₉ (*por ejemplo*, alquilo C₄, C₅, C₆, C₇ o C₈ o C₉).

40

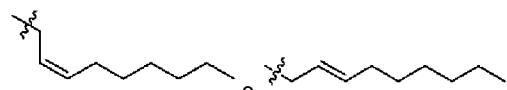
En algunas realizaciones, R' se selecciona de alquilo C₄ y alquenilo C₄. En ciertas realizaciones, R' se selecciona de alquilo C₅ y alquenilo C₅. En algunas realizaciones, R' se selecciona de alquilo C₆ y alquenilo C₆. En algunas realizaciones, R' se selecciona de alquilo C₇ y alquenilo C₇. En algunas realizaciones, R' se selecciona de alquilo C₉ y alquenilo C₉.

En algunas realizaciones, R' es



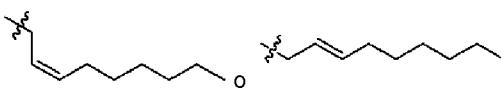
45

En algunas realizaciones, R' es



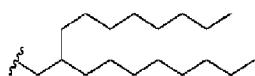
50

y M' es -OC(O)-. En otras realizaciones, R' es

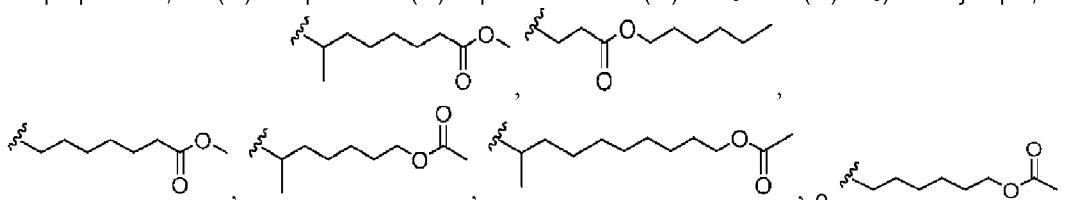


y M' es -C(O)O-.

- 5 En otras realizaciones, R' se selecciona de alquilo C₁₁ y alquenilo C₁₁. En otras realizaciones, R' se selecciona de alquilo C₁₂, alquenilo C₁₂, alquilo C₁₃, alquenilo C₁₃, alquilo C₁₄, alquenilo C₁₄, alquilo C₁₅, alquenilo C₁₅, alquilo C₁₆, alquenilo C₁₆, alquilo C₁₇, alquenilo C₁₇, alquilo C₁₈, y alquenilo C₁₈. En ciertas realizaciones, R' es alquilo C₄₋₁₈ lineal o alquenilo C₄₋₁₈. En ciertas realizaciones, R' está ramificado (*por ejemplo*, decan-2-ilo, undecan-3-ilo, dodecan-4-ilo, tridecan-5-ilo, tetradecan-6-ilo, 2-metilundecan-3-ilo, 2-metildecan-2-ilo, 3-metilundecan-3-ilo, 4-metildodecan-4-ilo, o heptadeca-9-ilo). En ciertas realizaciones, R' es



- 15 En ciertas realizaciones, R' es alquilo C₁₋₁₈ no sustituido. En ciertas realizaciones, R' es alquilo C₁₋₁₈ sustituido (*por ejemplo*, alquilo C₁₋₁₅ sustituido con, por ejemplo, un alcoxi tal como metoxi, o un carbociclo C₃₋₆ tal como 1-ciclopropilnilo, o C(O)O-alquilo o OC(O)-alquilo tal como C(O)OCH₃ o OC(O)CH₃). Por ejemplo, R' es



- 20 En algunas realizaciones, R'' se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₃₋₁₅ y alquenilo C₃₋₁₁ (*por ejemplo*, alquilo C₃₋₁₄ y alquenilo C₃₋₁₄). En algunas realizaciones, R'' es alquilo C₃, alquilo C₄, alquilo C₅, alquilo C₆, alquilo C₇, o alquilo C₈. En algunas realizaciones, R'' es alquilo C₉, alquilo C₁₀, alquilo C₁₁, alquilo C₁₂, alquilo C₁₃, alquilo C₁₄ o alquilo C₁₅.

- 25 En algunas realizaciones, M' es -C(O)O-. En algunas realizaciones, M' es -OC(O)-. En algunas realizaciones, M' es -OC(O)-M''-C(O)O-.

En otras realizaciones, M' es un grupo arilo o un grupo heteroarilo. Por ejemplo, M' puede seleccionarse del grupo que consiste en fenilo, oxazol, y tiazol.

- 30 En algunas realizaciones, M es -C(O)O-. En algunas realizaciones, M es -OC(O)-. En algunas realizaciones, M es -C(O)N(R')-. En algunas realizaciones, M es -P(O)(OR')O-. En algunas realizaciones, M es -OC(O)-M''-C(O)O-.

- 35 En otras realizaciones, M es un grupo arilo o un grupo heteroarilo. Por ejemplo, M puede seleccionarse del grupo que consiste en fenilo, oxazol, y tiazol.

En algunas realizaciones, M es lo mismo que M'. En otras realizaciones, M es diferente de M'.

- 40 En algunas realizaciones, M'' es un enlace. En algunas realizaciones, M'' es alquilo C₁₋₁₃ o alquenilo C₂₋₁₃. En algunas realizaciones, M'' es alquilo C₁₋₆ o alquenilo C₂₋₆. En ciertas realizaciones, M'' es alquilo o alquenilo lineal. En ciertas realizaciones, M'' está ramificado, por ejemplo, -CH(CH₃)CH₂-.

- 45 En algunas realizaciones, cada R₅ es H. En ciertas de dichas realizaciones, cada R₆ también es H.

En algunas realizaciones, R₇ es H. En otras realizaciones, R₇ es alquilo C₁₋₃ (*por ejemplo*, metilo, etilo, propilo o i-propilo).

En algunas realizaciones, R₂ y R₃ son independientemente alquilo C₅₋₁₄ o alquenilo C₅₋₁₄.

- 50 En algunas realizaciones, R₂ y R₃ son iguales. En algunas realizaciones, R₂ y R₃ son alquilo C₈. En ciertas realizaciones, R₂ y R₃ son alquilo C₂. En otras realizaciones, R₂ y R₃ son alquilo C₃. En algunas realizaciones, R₂ y R₃ son alquilo C₄. En ciertas realizaciones, R₂ y R₃ son alquilo C₅. En otras realizaciones, R₂ y R₃ son alquilo C₆. En algunas realizaciones, R₂ y R₃ son alquilo C₇.

- 55 En otras realizaciones, R₂ y R₃ son diferentes. En ciertas realizaciones, R₂ es alquilo C₈. En algunas

realizaciones, R₃ es alquilo C₁₋₇ (*por ejemplo*, alquilo C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, o C₇) o alquilo C₉.

En algunas realizaciones, R₇ y R₃ son H.

5 En ciertas realizaciones, R₂ es H.

En algunas realizaciones, m es 5, 7 o 9.

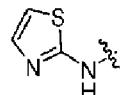
En algunas realizaciones, R⁴ se selecciona de -(CH₂)_nQ y -(CH₂)_nCHQR.

10 En algunas realizaciones, Q se selecciona del grupo que consiste en -OR, -OH, -O(CH₂)_nN(R)₂, -OC(O)R, -CX₃, -CN, -N(R)C(O)R, -N(H)C(O)R, -N(R)S(O)₂R, -N(R)S(O)₂R₈, -N(H)S(O)₂R, -N(R)C(O)N(R)₂, -N(H)C(O)N(R)₂, -N(H)C(O)N(H)(R), -N(R)C(S)N(R)₂, -N(H)C(S)N(R)₂, -N(H)C(S)N(H)(R), -C(R)N(R)₂C(O)OR, un carbociclo y un heterociclo.

15 En ciertas realizaciones, Q es -N(R)R₈, -N(R)S(O)₂R₈, -O(CH₂)_nOR, -N(R)C(=NR₉)N(R)₂, -N(R)C(=CHR₉)N(R)₂, -OC(O)N(R)₂ o -N(R)C(O)OR.

20 En ciertas realizaciones, Q es -N(OR)C(O)R, -N(OR)S(O)₂R, -N(OR)C(O)OR, -N(OR)C(O)N(R)₂, -N(OR)C(S)N(R)₂, -N(OR)C(=NR₉)N(R)₂, o -N(OR)C(=CHR₉)N(R)₂.

En ciertas realizaciones, Q es tiourea o un isóstero de la misma, por ejemplo,



25 o -NHC(=NR₉)N(R)₂.

En ciertas realizaciones, Q es -C(=NR₉)N(R)₂. Por ejemplo, cuando Q es -C(=NR₉)N(R)₂, n es 4 o 5. Por ejemplo, R₉ es -S(O)₂N(R)₂.

30 En ciertas realizaciones, Q es -C(=NR₉)R o -C(O)N(R)OR, por ejemplo, -CH(=N-OCH₃), -C(O)NH-OH, -C(O)NH-OCH₃, -C(O)N(CH₃)-OH o -C(O)N(CH₃)-OCH₃.

35 En ciertas realizaciones, Q es -OH.

En ciertas realizaciones, Q es un heteroarilo de 5 a 10 miembros sustituido o no sustituido, *por ejemplo*, Q es un triazol, un imidazol, una pirimidina, una purina, 2-amino-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona-9-ilo (o guanin-9-il), adenin-9-il, citosin-1-il o uracilo-1-il, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre alquilo, OH, alcoxi, -alquil-OH, -alquil-O-alquilo, y el sustituyente puede estar sustituido adicionalmente. En ciertas realizaciones, Q es un heterocicloalquilo de 5 a 14 miembros sustituido, *por ejemplo*, sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre oxo (=O), OH, amino, mono- o dialquilamino y alquilo C₁₋₃. Por ejemplo, Q es 4-metilpiperazinilo, 4-(4-metoxibencil)piperazinilo, isoindolin-2-il-1,3-diona, pirrolidin-1-il-2,5-diona o imidazolidin-3-il-2,4-diona.

45 En ciertas realizaciones, Q es -NHR₈, en el que R₈ es un cicloalquilo C₃₋₆ opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre oxo (=O), amino (NH₂), mono- o dialquilamino, alquilo C₁₋₃ y halo. Por ejemplo, R₈ es ciclobutenilo, por ejemplo, 3-(dimetilamino)ciclobut-3-eno-4-il-1,2-diona. En realizaciones adicionales, R₈ es un cicloalquilo C₃₋₆ opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre oxo (=O), amino (NH₂), mono- o dialquilamino, alquilo C₁₋₃ y halo, en donde el mono- o dialquilamino y el alquilo C₁₋₃ están además sustituidos. Por ejemplo, R₈ es ciclobutenilo sustituido con uno o más de oxo, amino y alquilamino, en donde el alquilamino está además sustituido, por ejemplo, con uno o más de amino, mono- o dialquilamino y halo. Por ejemplo, R₈ es 3-(((dimetilamino)etil)amino)ciclobut-3-enil-1,2-diona.

55 En ciertas realizaciones, Q es -NHR₈, en el que R₈ es un heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de amino (NH₂), mono- o dialquilamino, alquilo C₁₋₃ alquilo y halo. Por ejemplo, R₈ es tiazol o imidazol.

60 En ciertas realizaciones, Q es -NHC(=NR₉)N(R)₂ en el que R₉ es CN, alquilo C₁₋₆, NO₂, -S(O)₂N(R)₂, -OR, -S(O)₂R o H. Por ejemplo, Q es -NHC(=NR₉)N(CH₃)₂, -NHC(=NR₉)NHCH₃, -NHC(=NR₉)NH₂. En algunas realizaciones, Q es -NHC(=NR₉)N(R)₂ en el que R₉ es CN y R es alquilo C₁₋₃ sustituido con mono- o dialquilamino, por ejemplo, R es ((dimetilamino)etil)amino. En algunas realizaciones, Q is -NHC(=NR₉)N(R)₂ en el que R₉ es alquilo C₁₋₆, NO₂, -S(O)₂N(R)₂, -OR, -S(O)₂R, o H y R es alquilo C₁₋₃ sustituido con mono- o dialquilamino, por ejemplo, R es ((dimetilamino)etil)amino.

En algunas realizaciones, Q es $-\text{NHC}(=\text{CHR}_9)\text{N}(\text{R})_2$, en el que R_9 es NO_2 , CN , alquilo C_{1-6} , $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R})_2$, $-\text{OR}$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}$, o H . Por ejemplo, Q es $-\text{NHC}(=\text{CHR}_9)\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{NHC}(=\text{CHR}_9)\text{NHCH}_3$, o $-\text{NHC}(=\text{CHR}_9)\text{NH}_2$.

- 5 En ciertas realizaciones, Q es $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R})_2$, $-\text{N}(\text{R})\text{C}(\text{O})\text{OR}$, $-\text{N}(\text{OR})\text{C}(\text{O})\text{OR}$, tal como $-\text{OC}(\text{O})\text{NHCH}_3$, $-\text{N}(\text{OH})\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$, $-\text{N}(\text{OH})\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$, $-\text{N}(\text{OCH}_3)\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$, $-\text{N}(\text{OCH}_3)\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$, $-\text{N}(\text{OH})\text{S}(\text{O})_2\text{CH}_3$ o $-\text{NHC}(\text{O})\text{OCH}_3$.

- 10 En ciertas realizaciones, Q es $-\text{N}(\text{R})\text{C}(\text{O})\text{R}$, en donde R es alquilo opcionalmente sustituido con alcoxilo C_{1-3} o $\text{S}(\text{O})_t$ alquilo C_{1-3} , en donde t es 0, 1 o 2.

En ciertas realizaciones, Q es un arilo C_{6-10} sustituido o no sustituido (tal como fenilo) o cicloalquilo C_{3-6} .

- 15 En algunas realizaciones, n es 1. En otras realizaciones, n es 2. En aspectos adicionales, n es 3. En ciertos otros aspectos, n es 4. Por ejemplo, R_4 puede ser $-(\text{CH}_2)_2\text{OH}$. Por ejemplo, R_4 puede ser $-(\text{CH}_2)_3\text{OH}$. Por ejemplo, R_4 puede ser $-(\text{CH}_2)_4\text{OH}$. Por ejemplo, R_4 puede ser bencilo. Por ejemplo, R_4 puede ser 4-metoxibencilo.

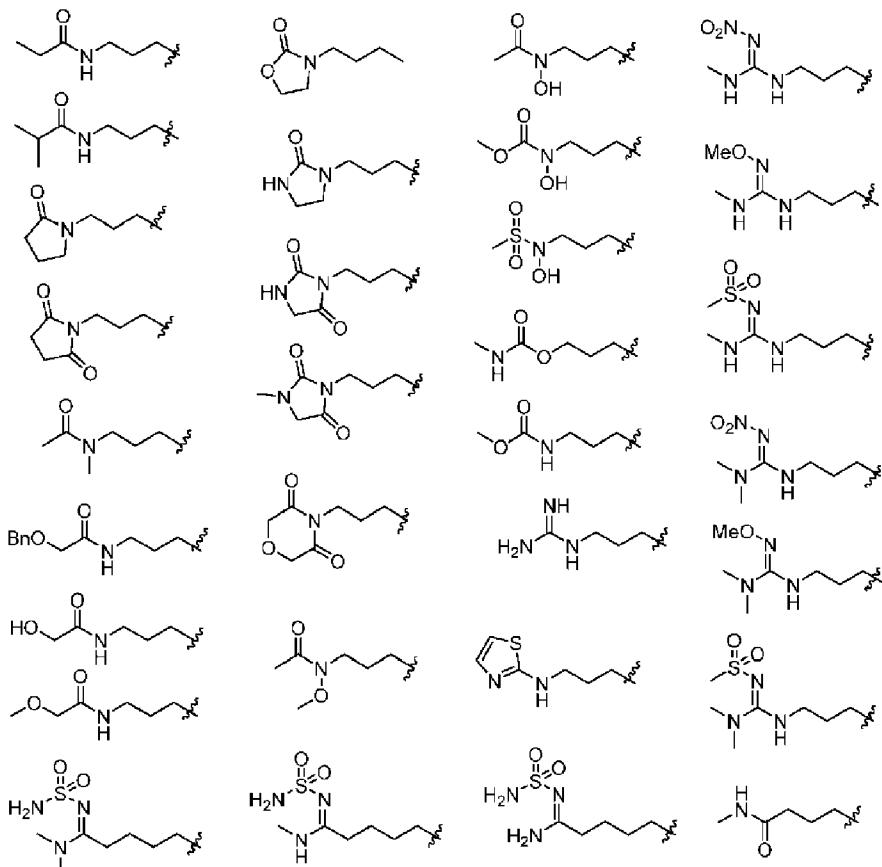
- 20 En algunas realizaciones, R_4 es un carbociclo C_{3-6} . En algunas realizaciones, R_4 es un cicloalquilo C_{3-6} . Por ejemplo, R_4 puede ser ciclohexilo opcionalmente sustituido con, por ejemplo, OH, halo, alquilo C_{1-6} , etc. Por ejemplo, R_4 puede ser 2-hidroxiciclohexilo.

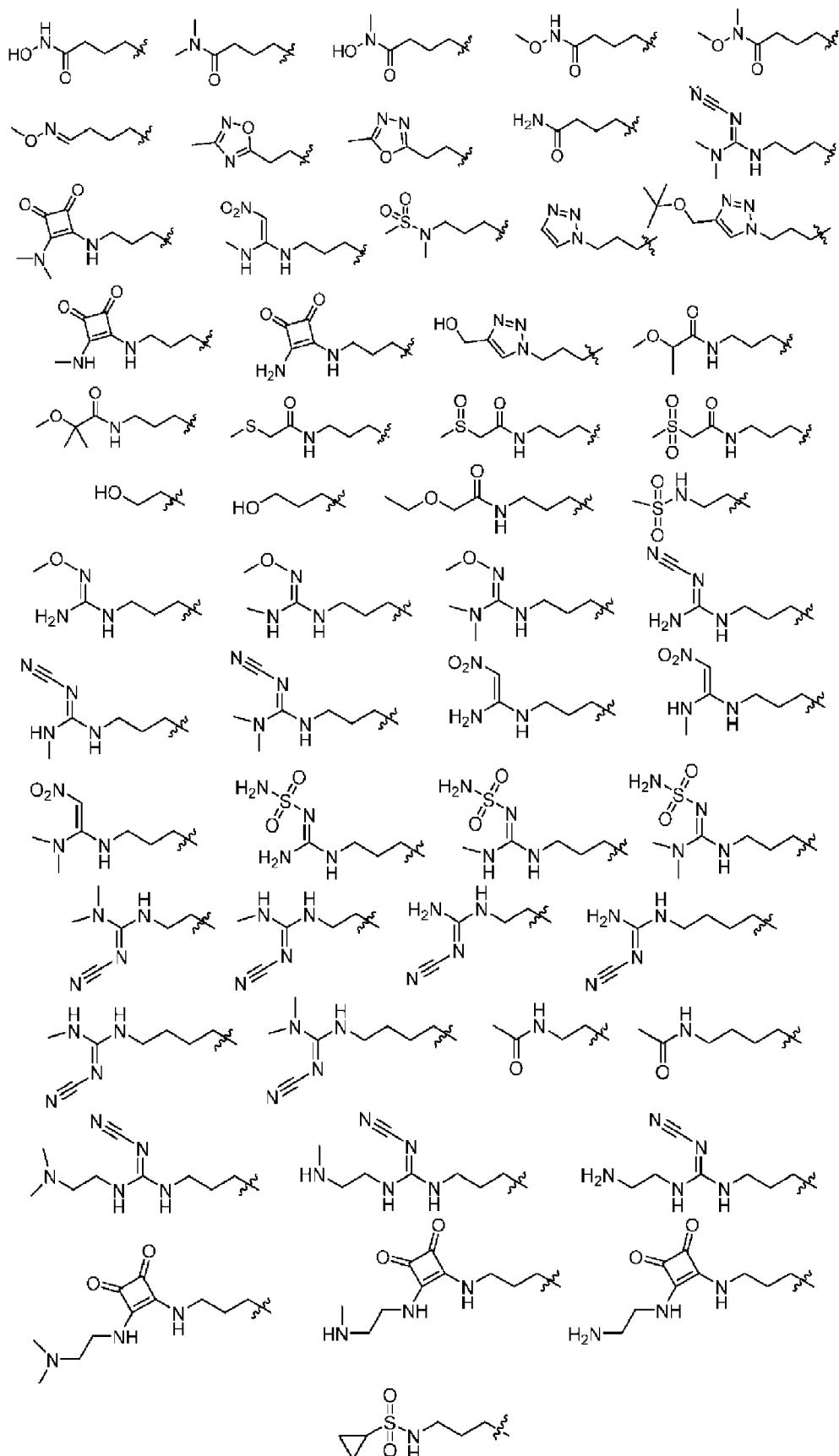
En algunas realizaciones, R es H.

- 25 En algunas realizaciones, R es alquilo C_{1-3} sustituido con mono- o dialquilamino, por ejemplo, R es ((dimetilamino)etil)amino. En algunas realizaciones, R es alquilo C_{1-3} no sustituido o alquenilo C_{2-3} no sustituido. Por ejemplo, R_4 puede ser $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$ o $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_3$.

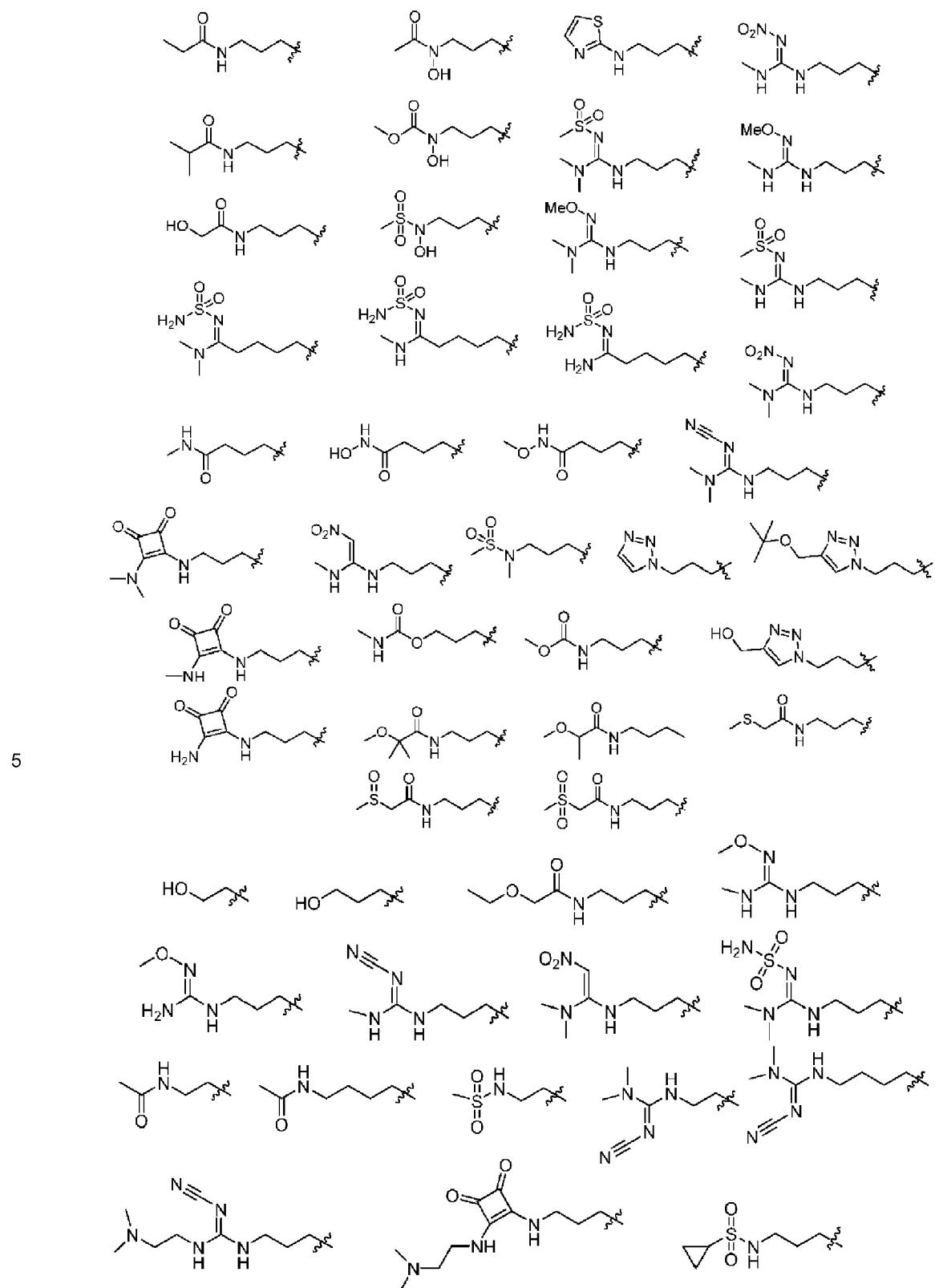
- 30 En algunas realizaciones, R es alquilo C_{1-3} sustituido, por ejemplo, CH_2OH . Por ejemplo, R_4 puede ser $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{OH}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{OBn}$, $-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{OCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$, CH_2SCH_3 , $\text{CH}_2\text{S}(\text{O})\text{CH}_3$, $\text{CH}_2\text{S}(\text{O})_2\text{CH}_3$, o $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})_2$.

En algunas realizaciones, R_4 se selecciona de cualquiera de los siguientes grupos:





En algunas realizaciones, R_4 se selecciona de cualquiera de los siguientes grupos:



sustituido (*por ejemplo*, carbociclo C₃₋₁₈, carbociclo C₃₋₁₅, carbociclo C₃₋₁₂, o carbociclo C₃₋₁₀), ya sea aromático o no aromático. En algunas realizaciones, R₂ y R₃, junto con el átomo al que están unidos, forman un carbociclo C₃₋₆. En otras realizaciones, R₂ y R₃, junto con el átomo al que están unidos, forman un carbociclo C₆, tal como un grupo ciclohexilo o fenilo. En ciertas realizaciones, el heterociclo o carbociclo C₃₋₆ está sustituido con uno o más grupos alquilo (*por ejemplo*, en el mismo átomo del anillo o en átomos del anillo adyacentes o no adyacentes). Por ejemplo, R₂ y R₃, junto con el átomo al que están unidos, pueden formar un grupo ciclohexilo o fenilo que porta una o más sustituciones de alquilo C₅. En ciertas realizaciones, el heterociclo o carbociclo C₃₋₆ formado por R₂ y R₃ está sustituido con grupos carbociclo. Por ejemplo, R₂ y R₃, junto con el átomo al que están unidos, pueden formar un grupo ciclohexilo o fenilo que está sustituido con ciclohexilo. En algunos, R₂ y R₃, junto con el átomo al que están unidos, forman un carbociclo C₇₋₁₅, tal como un grupo cicloheptilo, ciclopentadecanilo o naftilo.

En algunas realizaciones, R₄ se selecciona de -(CH₂)_nQ y -(CH₂)_nCHQR. En algunas realizaciones, Q se selecciona del grupo que consiste en -OR, -OH, -O(CH₂)_nN(R)₂, -OC(O)R, -CX₃, -CN, -N(R)C(O)R, -N(H)C(O)R, -N(R)S(O)₂R, -N(H)S(O)₂R, -N(R)S(O)₂R₈, -N(R)C(O)N(R)₂, -N(H)C(O)N(R)₂, -N(H)C(O)N(H)(R), -N(R)C(S)N(R)₂, -N(H)C(S)N(R)₂, -N(H)C(S)N(H)(R), y un heterociclo. En otras realizaciones, Q se selecciona del grupo que consiste en un imidazol, una pirimidina y una purina.

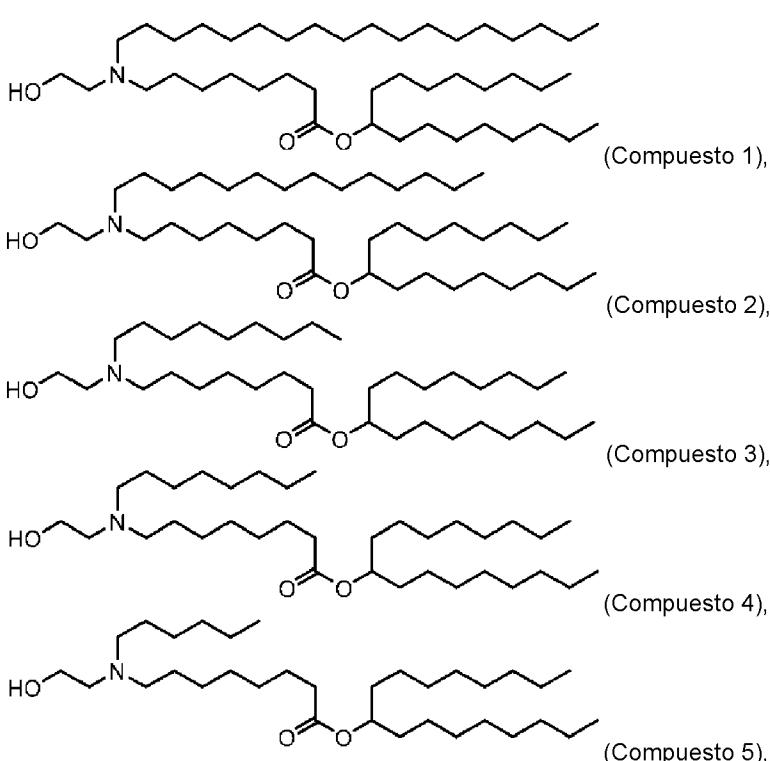
En algunas realizaciones, R₂ y R₃, junto con el átomo al que están unidos, forman un heterociclo o carbociclo. En algunas realizaciones, R₂ y R₃, junto con el átomo al que están unidos, forman un carbociclo C₃₋₆, tal como un grupo fenilo. En ciertas realizaciones, el heterociclo o carbociclo C₃₋₆ está sustituido con uno o más grupos alquilo (*por ejemplo*, en el mismo átomo del anillo o en átomos del anillo adyacentes o no adyacentes). Por ejemplo, R₂ y R₃, junto con el átomo al que están unidos, pueden formar un grupo fenilo que porta una o más sustituciones de alquilo C₅.

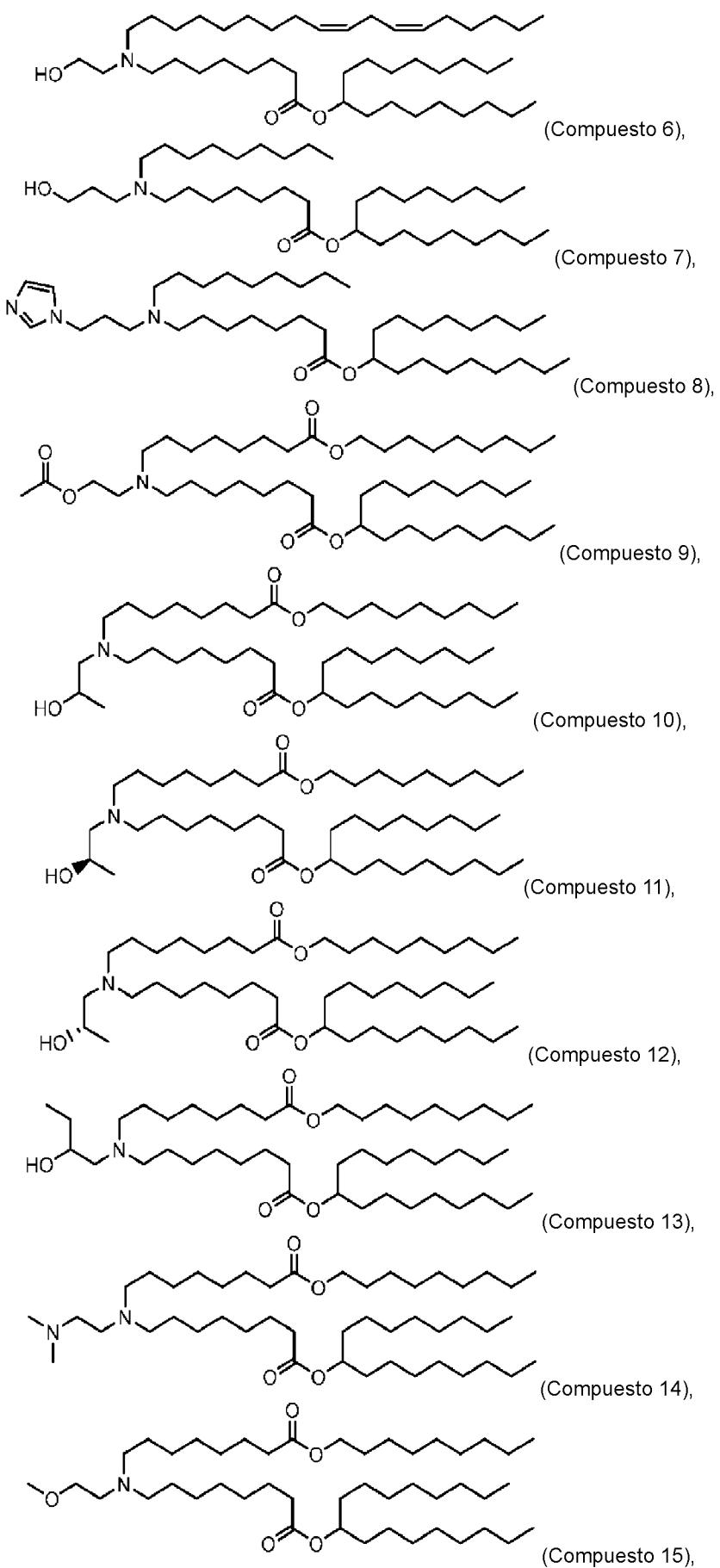
En algunas realizaciones, al menos una aparición de R₅ y R₆ es alquilo C₁₋₃, por ejemplo, metilo. En algunas realizaciones, uno de los R₅ y R₆ adyacentes a M es alquilo C₁₋₃, por ejemplo, metilo, y el otro es H. En algunas realizaciones, uno de los R₅ y R₆ adyacentes a M es alquilo C₁₋₃, por ejemplo, metilo, y el otro es H, y M es -OC(O)- o -C(O)O-.

En algunas realizaciones, al menos una aparición de R₅ y R₆ es alquilo C₁₋₃, por ejemplo, metilo. En algunas realizaciones, uno de los R₅ y R₆ adyacentes a M es alquilo C₁₋₃, por ejemplo, metilo, y el otro es H. En algunas realizaciones, uno de los R₅ y R₆ adyacentes a M es alquilo C₁₋₃, por ejemplo, metilo, y el otro es H, y M es -OC(O)- o -C(O)O-.

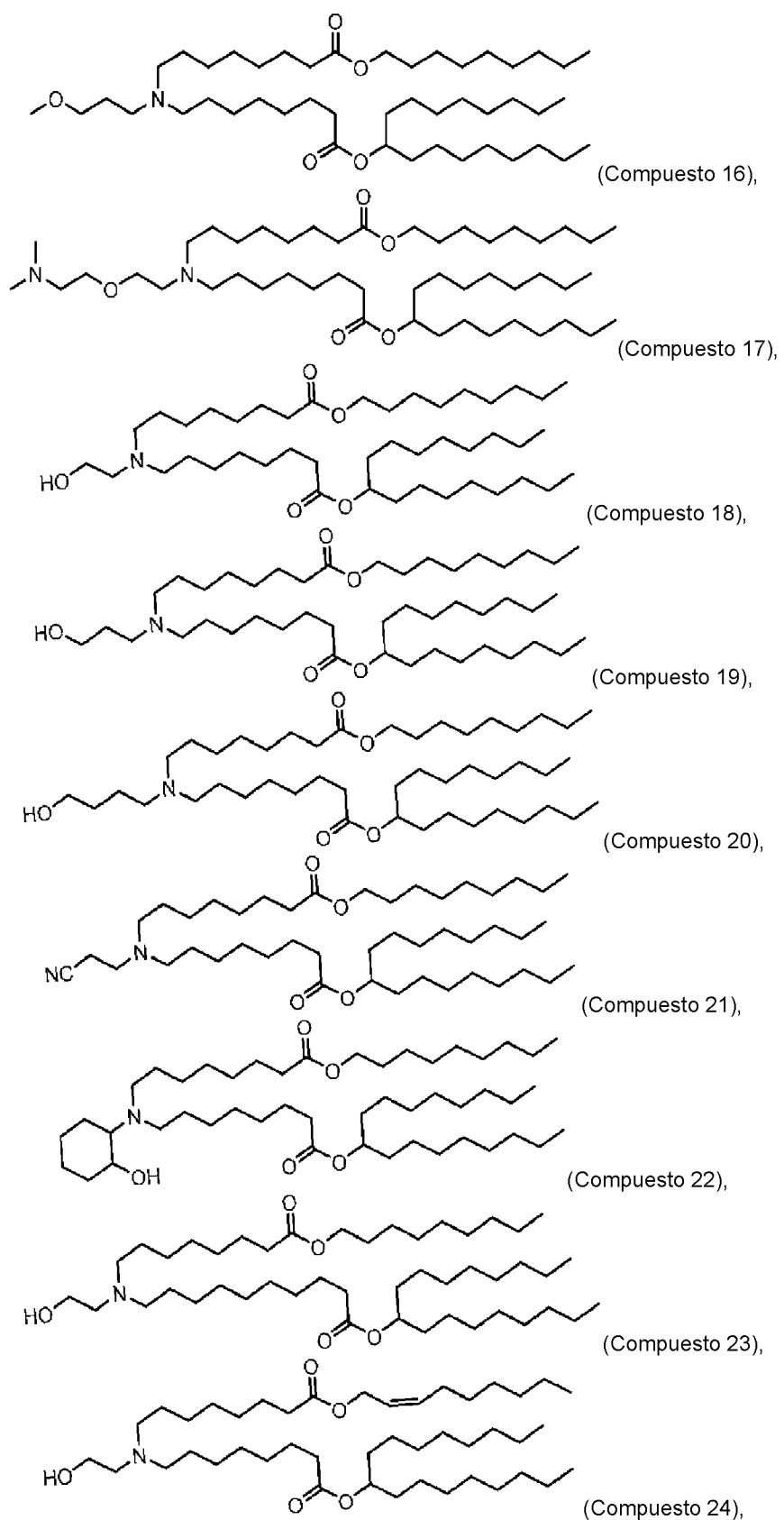
En algunas realizaciones, cada aparición de R₅ y R₆ es H.

En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula (I) se selecciona del grupo que consiste en:

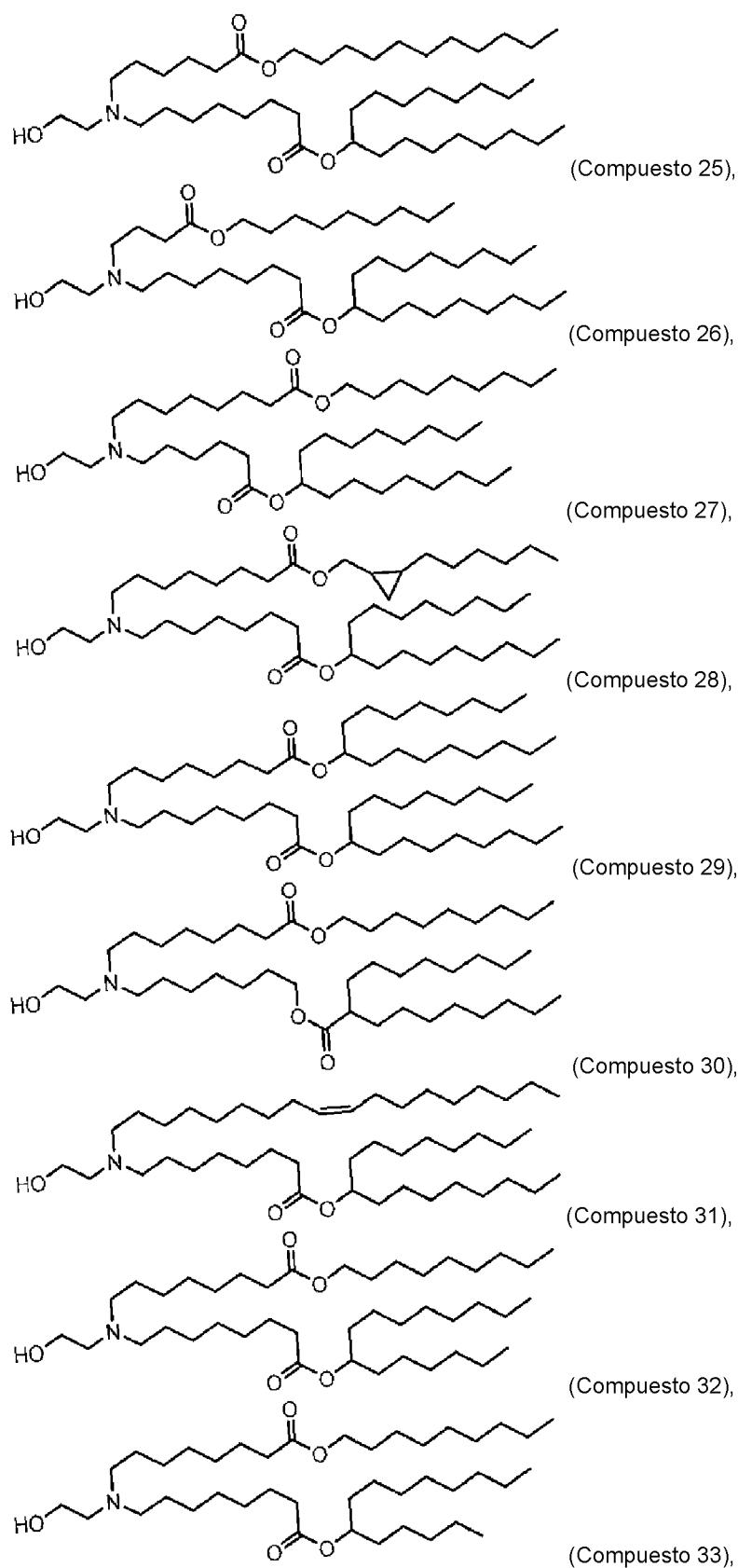


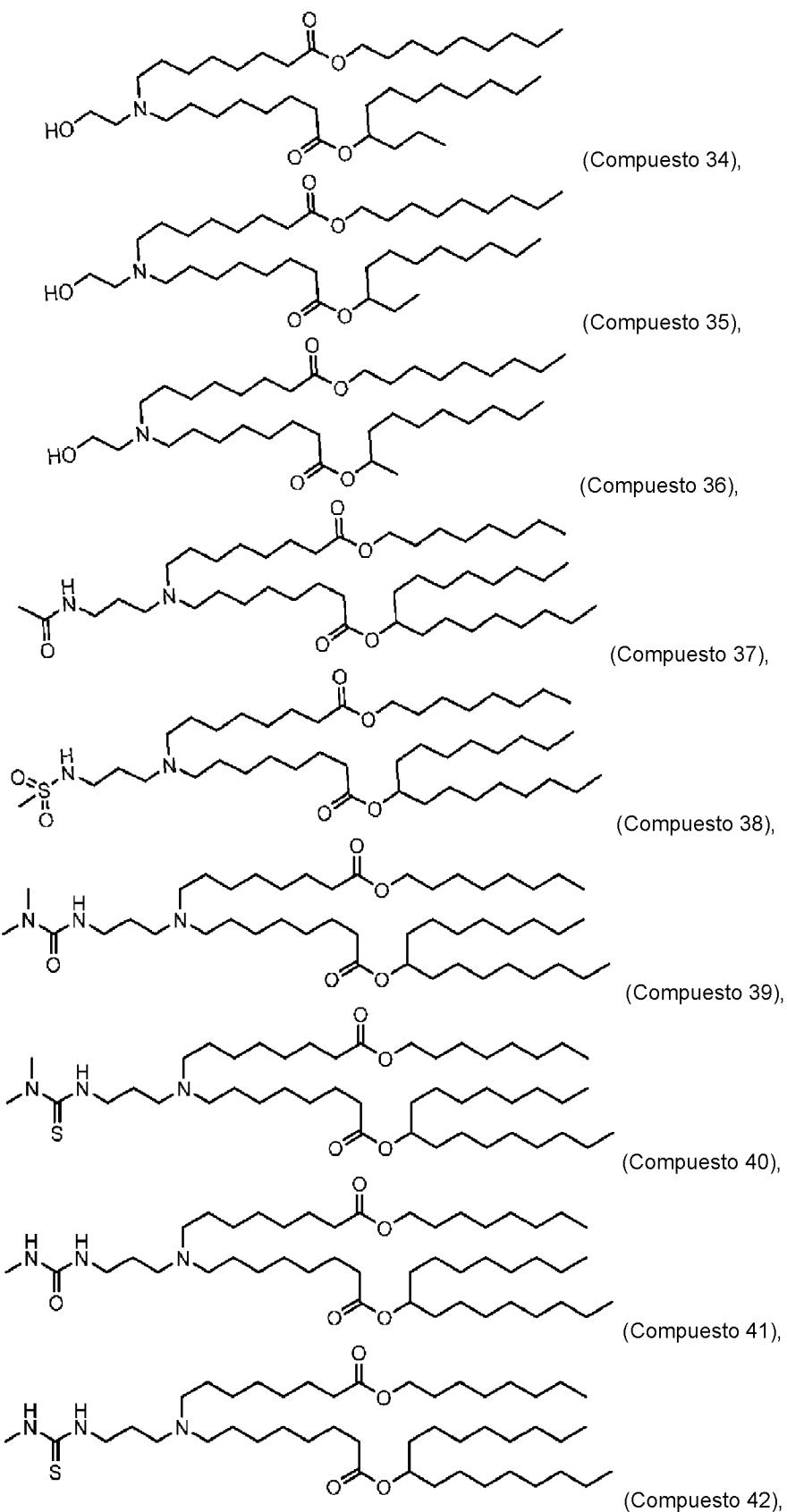


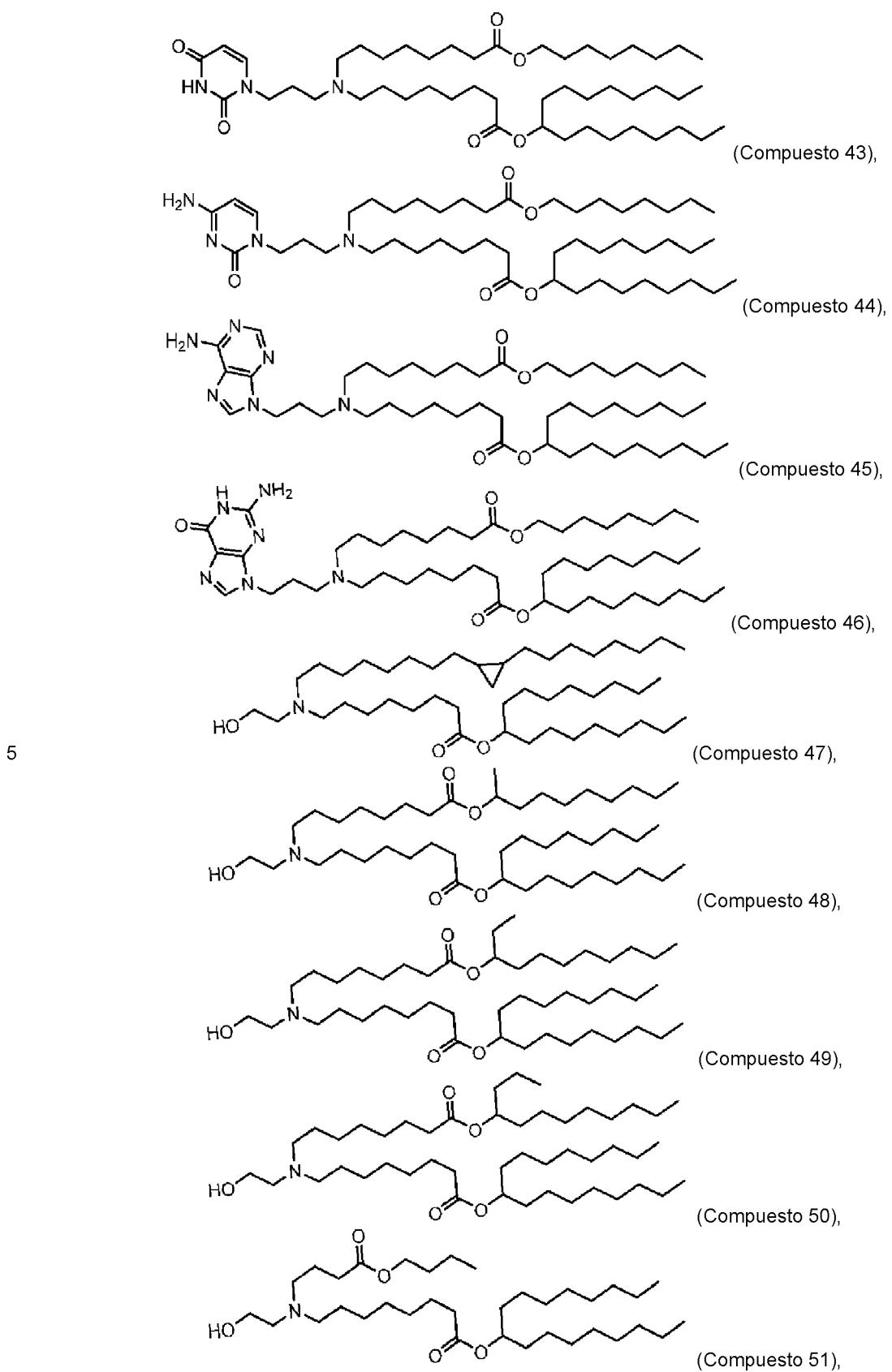
5

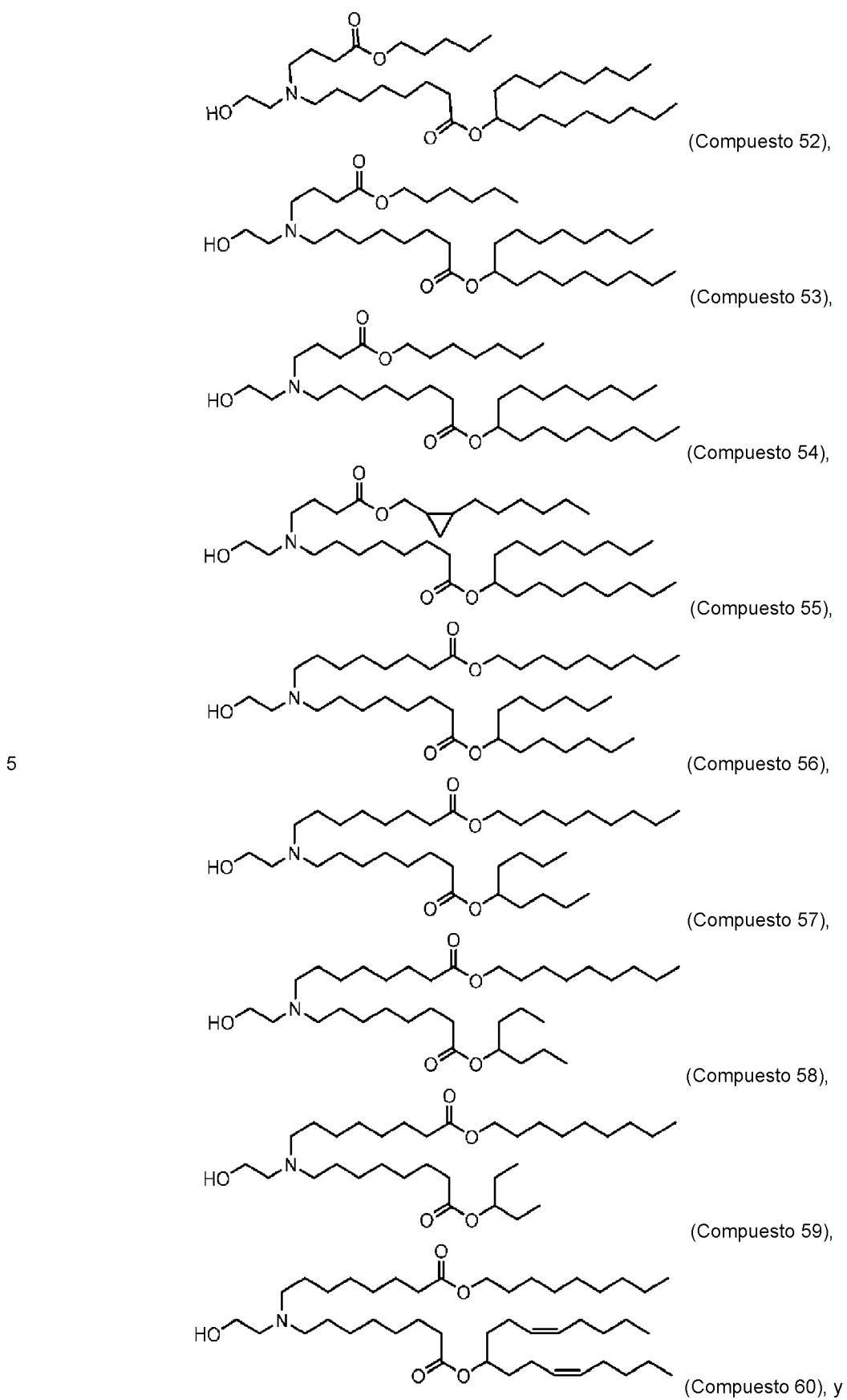


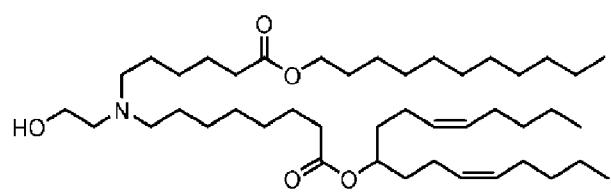
5





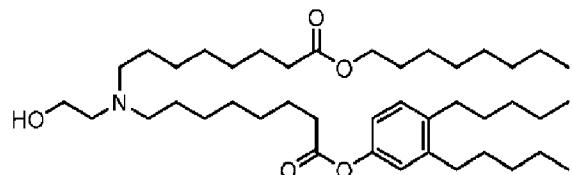






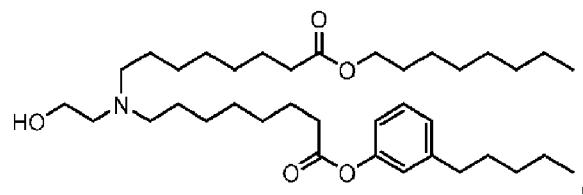
(Compuesto 61).

En realizaciones adicionales, el compuesto de fórmula (I) se selecciona de entre el grupo que consiste en:

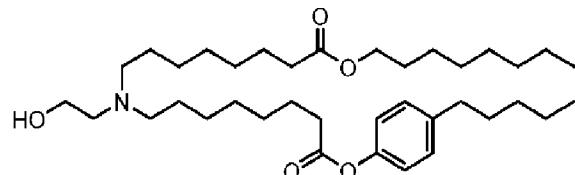


5

(Compuesto 62),



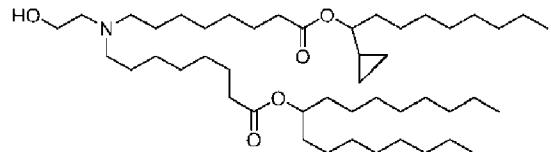
(Compuesto 63), y



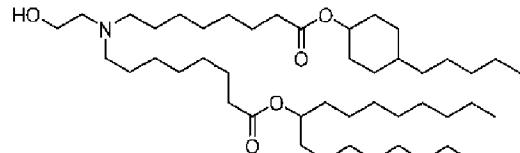
(Compuesto 64).

10

En algunas realizaciones, el compuesto de la Fórmula (I) se selecciona de entre el grupo que consiste en:

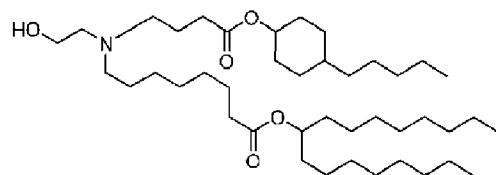


(Compuesto 65),

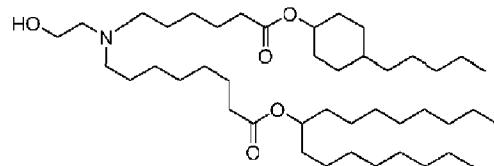


(Compuesto 66),

15

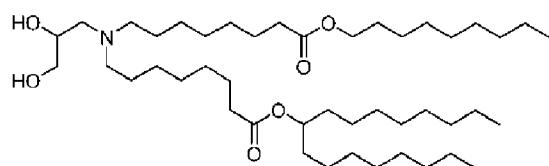


(Compuesto 67),

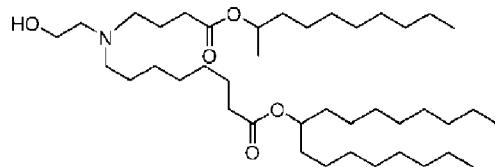


(Compuesto 68),

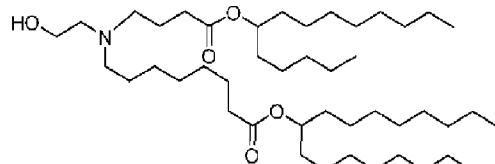
20



(Compuesto 69),

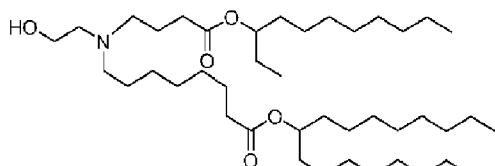


(Compuesto 70),

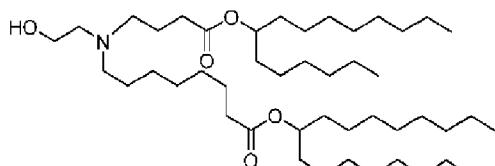


(Compuesto 71),

5

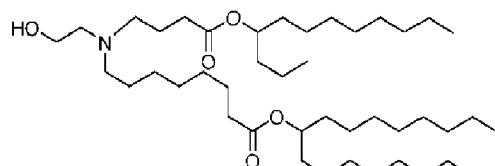


(Compuesto 72),

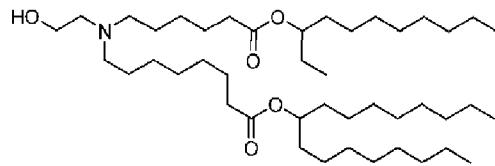


(Compuesto 73),

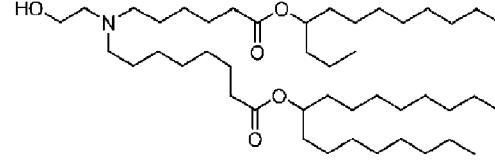
10



(Compuesto 74),

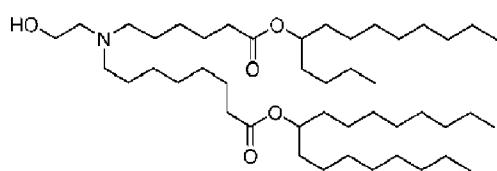


(Compuesto 75),

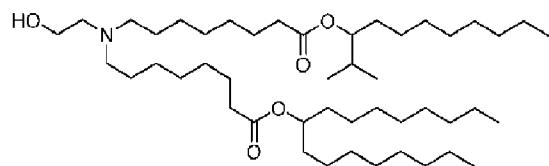


(Compuesto 76),

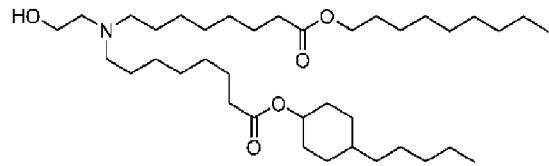
15



(Compuesto 77),

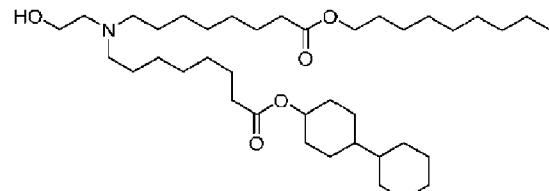


(Compuesto 78),

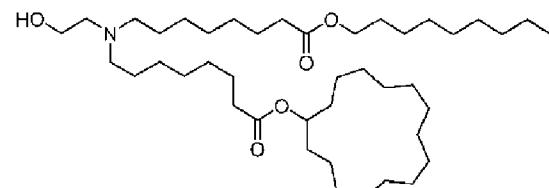


(Compuesto 79),

5

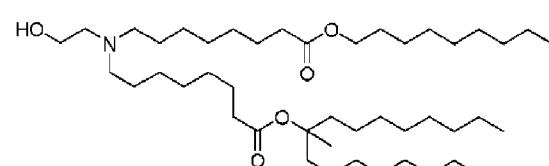


(Compuesto 80),

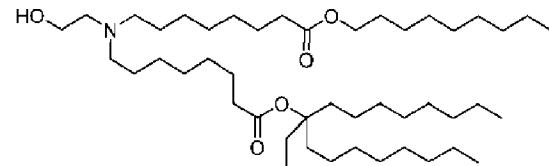


(Compuesto 81),

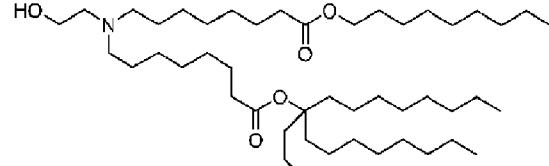
10



(Compuesto 82),

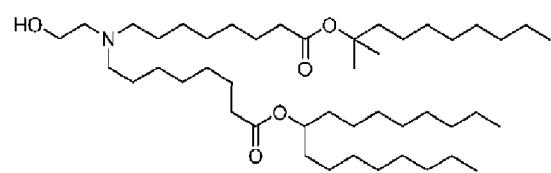


(Compuesto 83),

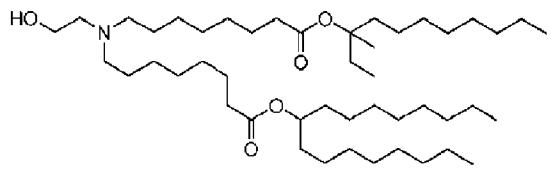


(Compuesto 84),

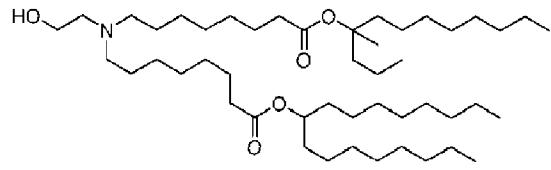
15



(Compuesto 85),

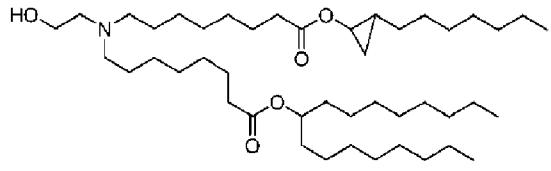


(Compuesto 86),

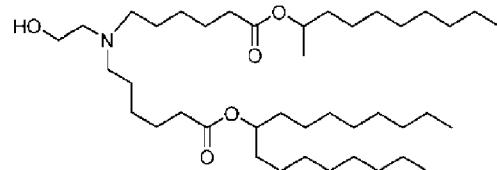


(Compuesto 87),

5

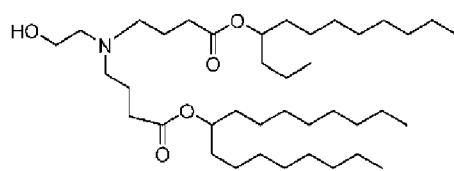


(Compuesto 88),

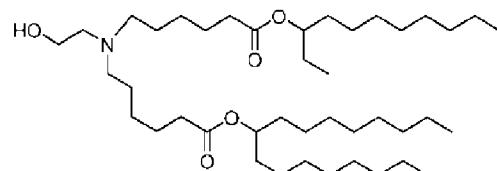


(Compuesto 89),

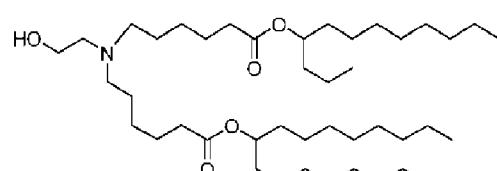
10



(Compuesto 90),

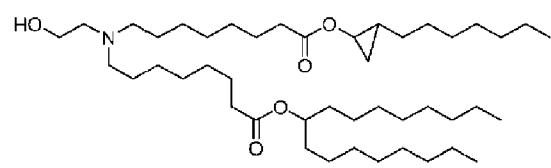


(Compuesto 91),

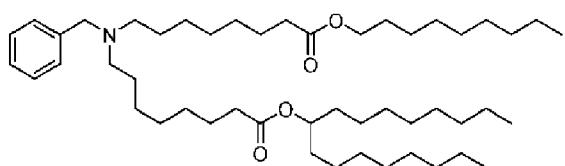


(Compuesto 92),

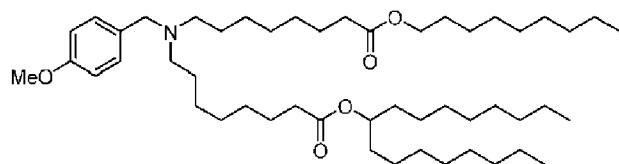
15



(Compuesto 93),

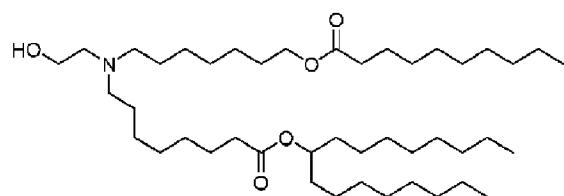


(Compuesto 94),

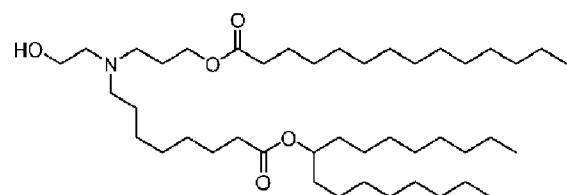


5

(Compuesto 95),

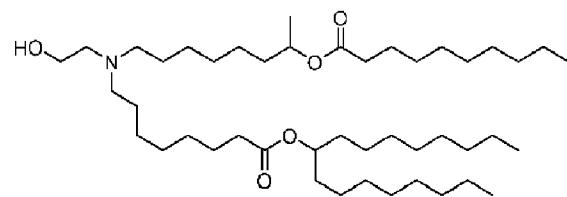


(Compuesto 96),

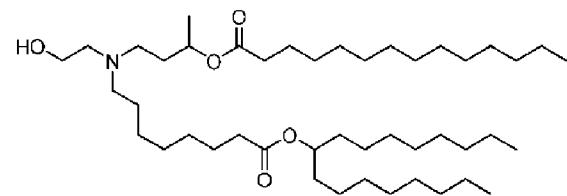


(Compuesto 97),

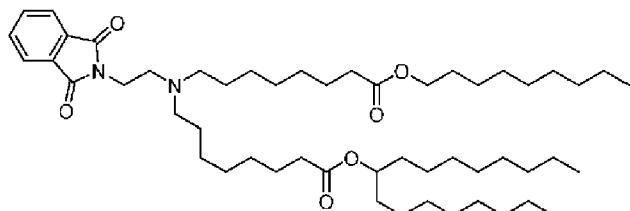
10



(Compuesto 98),

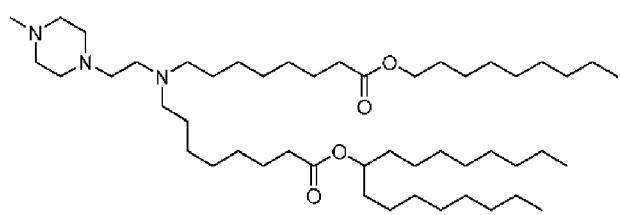


(Compuesto 99),

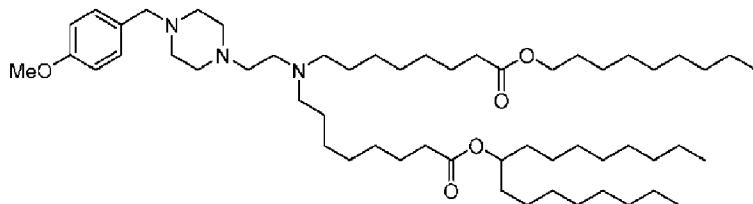


(Compuesto 100),

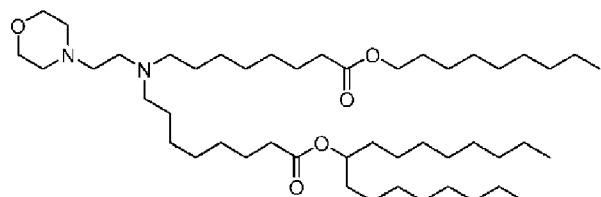
15



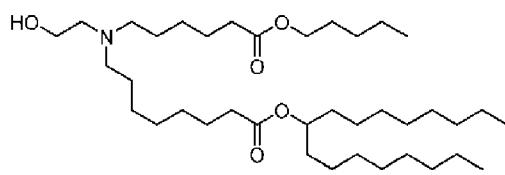
(Compuesto 101),



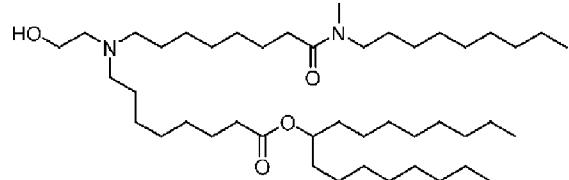
(Compuesto 102),



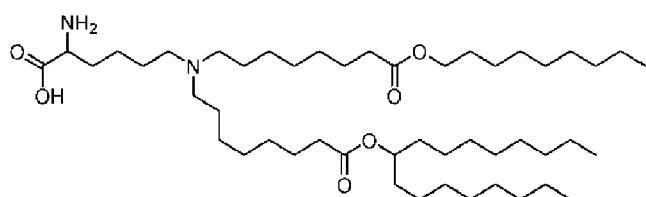
(Compuesto 103),



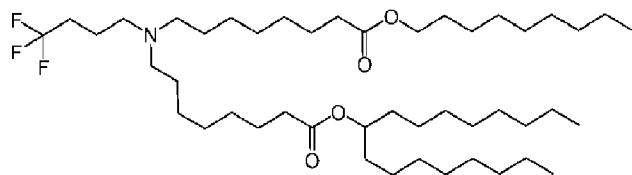
(Compuesto 104),



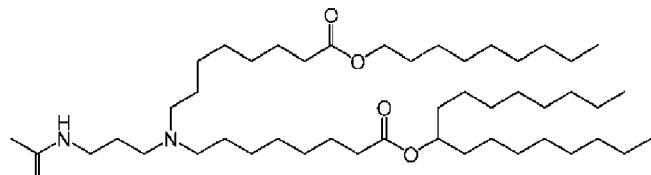
(Compuesto 105),



(Compuesto 106),



(Compuesto 107),

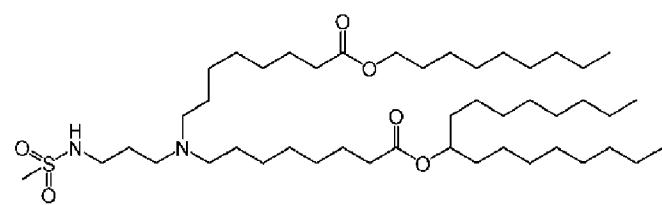


(Compuesto 108),

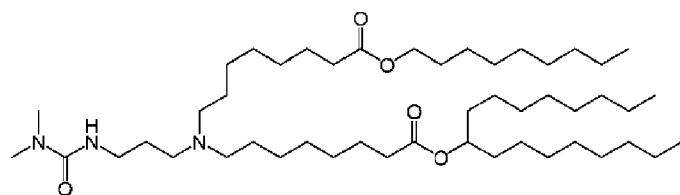
5

10

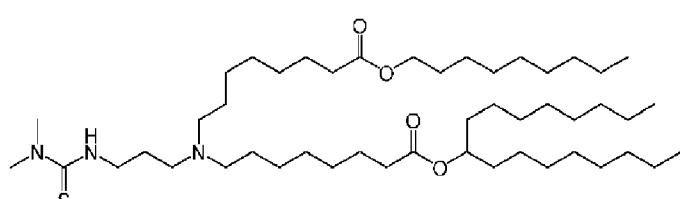
15



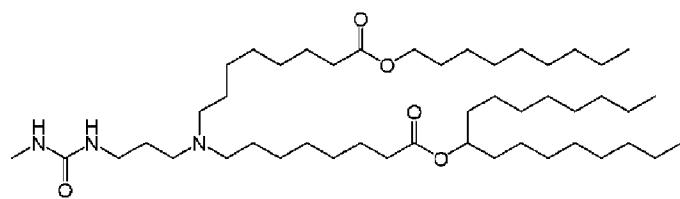
(Compuesto 109),



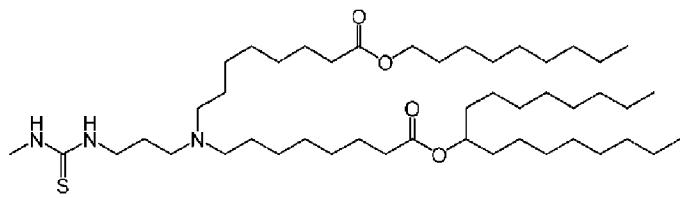
(Compuesto 110),



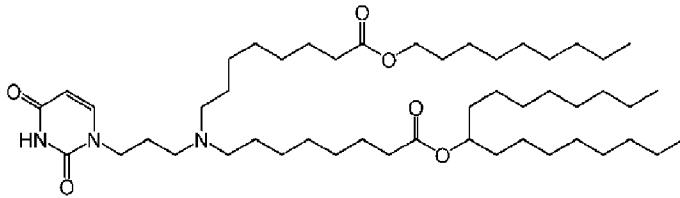
(Compuesto 111),



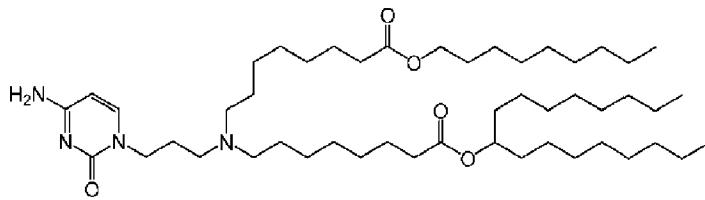
(Compuesto 112),



(Compuesto 113),



(Compuesto 114),

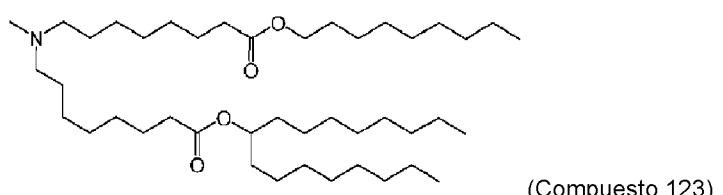
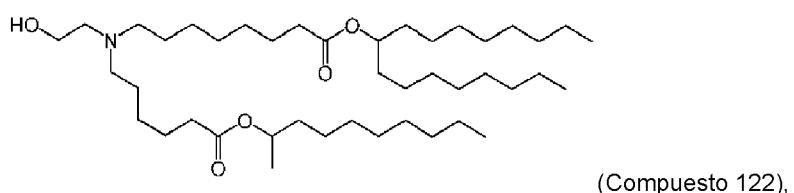
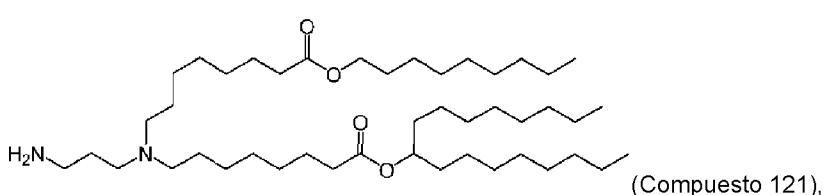
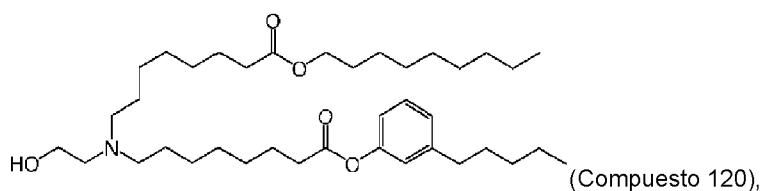
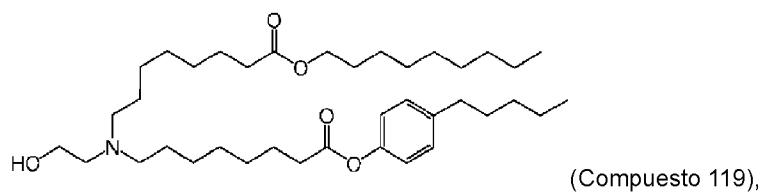
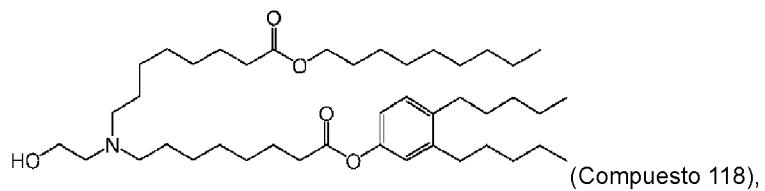
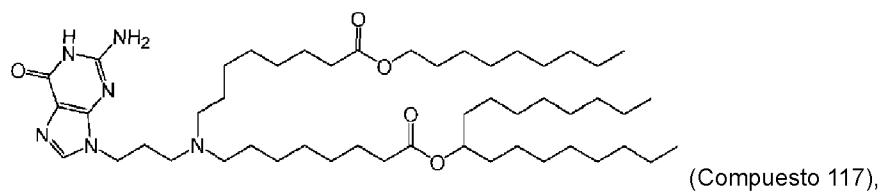
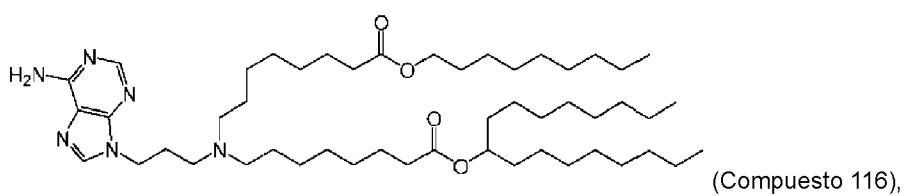


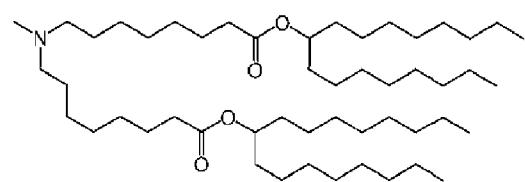
(Compuesto 115),

5

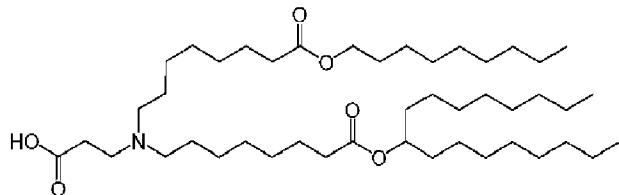
10

15

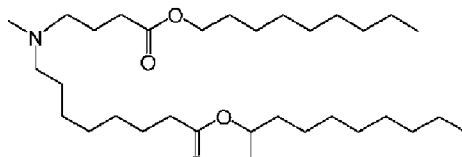




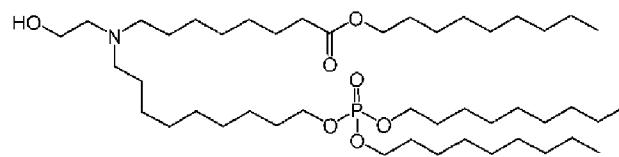
(Compuesto 124),



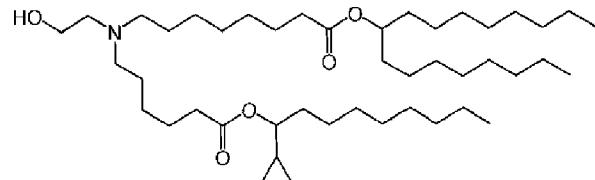
(Compuesto 125),



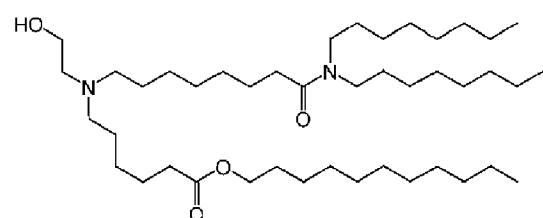
(Compuesto 126),



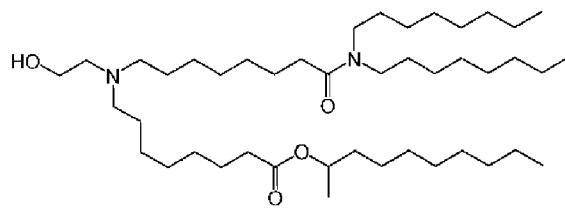
(Compuesto 127),



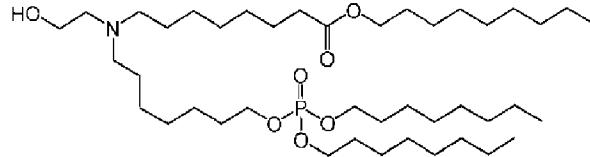
(Compuesto 128),



(Compuesto 129),



(Compuesto 130),

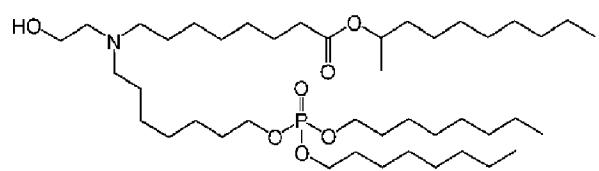


(Compuesto 131),

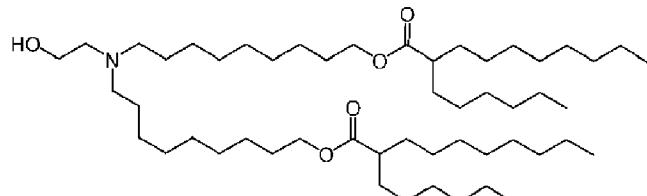
5

10

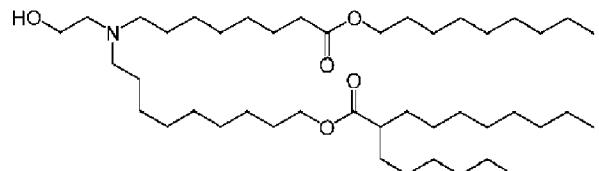
15



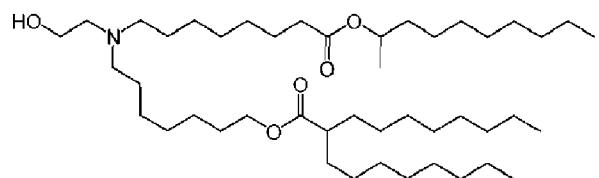
(Compuesto 132),



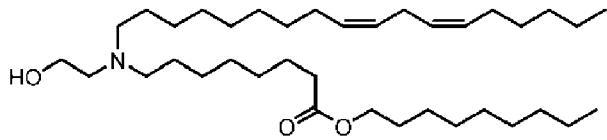
(Compuesto 133),



(Compuesto 134),

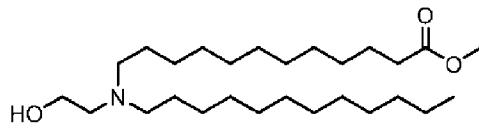


(Compuesto 135),

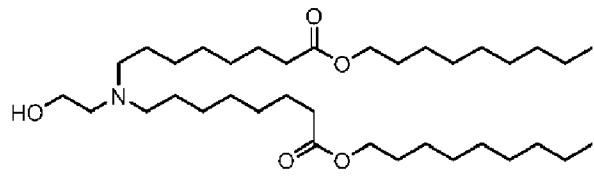


(Compuesto 136),

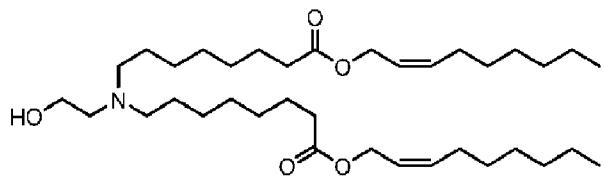
10



(Compuesto 137),

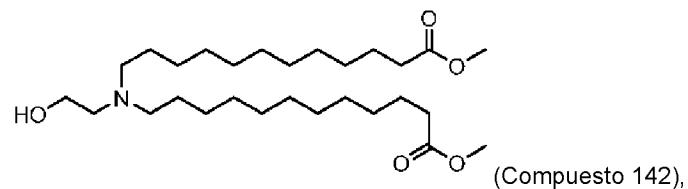
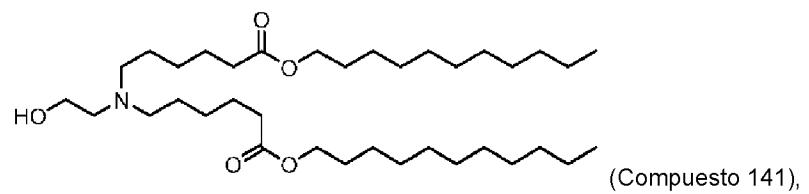
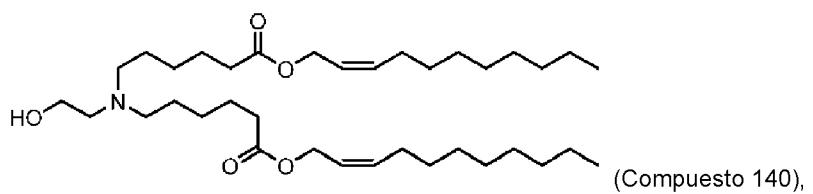


(Compuesto 138),

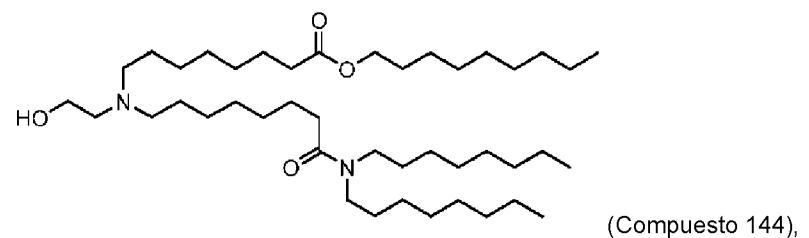
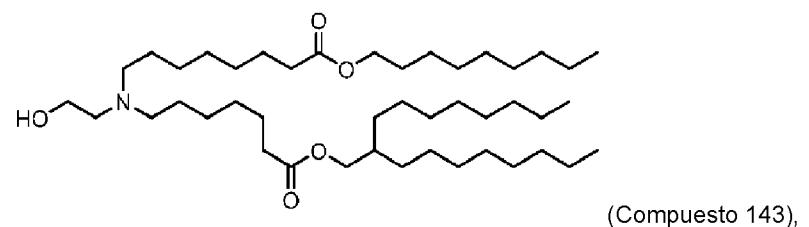


(Compuesto 139),

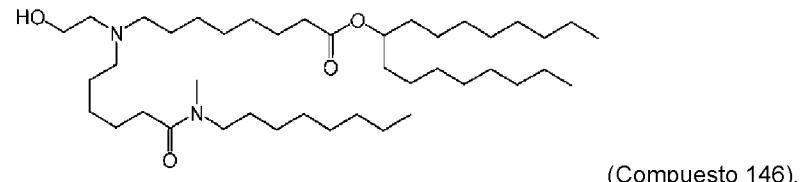
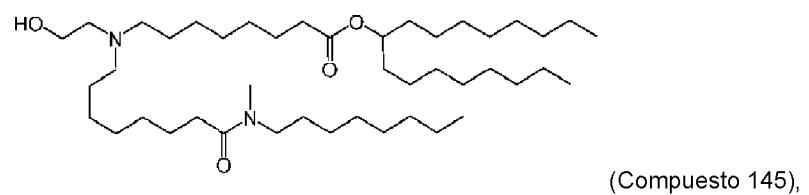
15



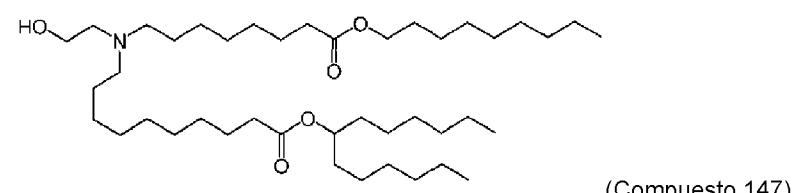
5

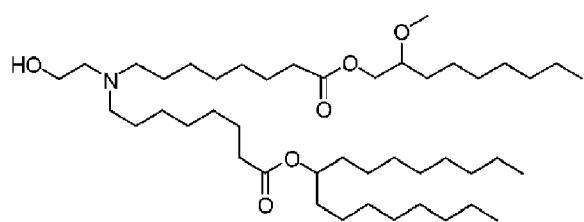


10

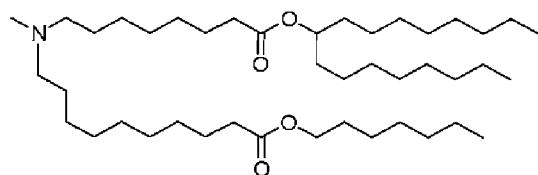


15

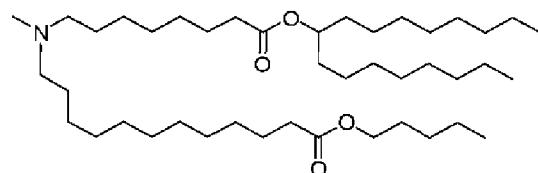




(Compuesto 148),

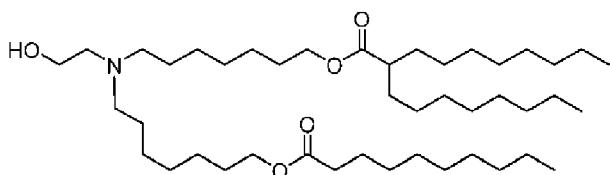


(Compuesto 149),

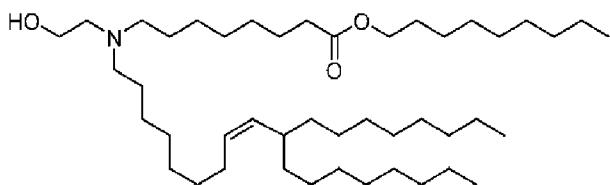


(Compuesto 150),

5

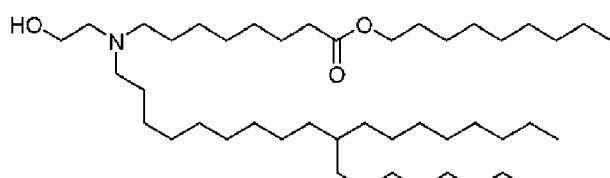


(Compuesto 151),

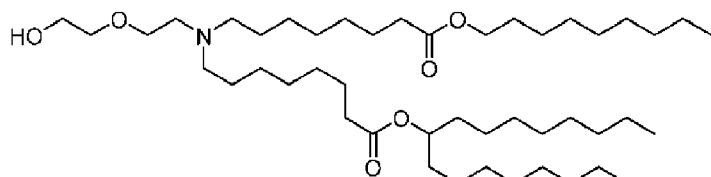


(Compuesto 152),

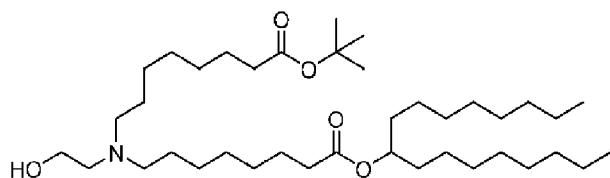
10



(Compuesto 153),

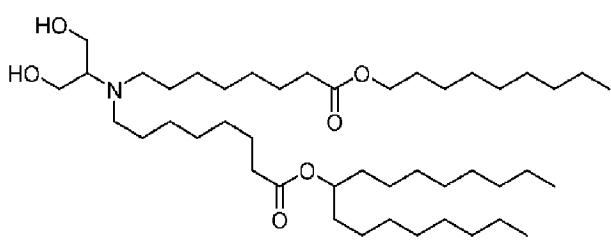


(Compuesto 154),

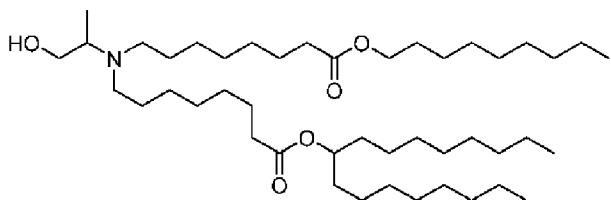


(Compuesto 155),

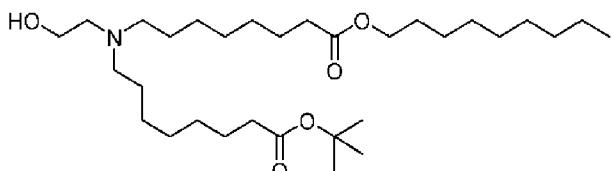
15



(Compuesto 156),

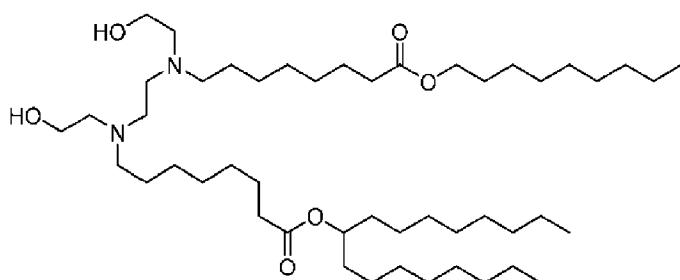


(Compuesto 157),

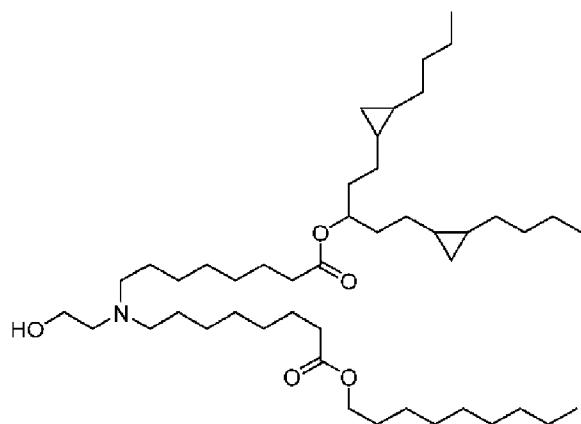


(Compuesto 158),

5

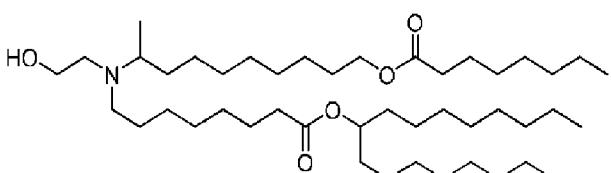


(Compuesto 159),

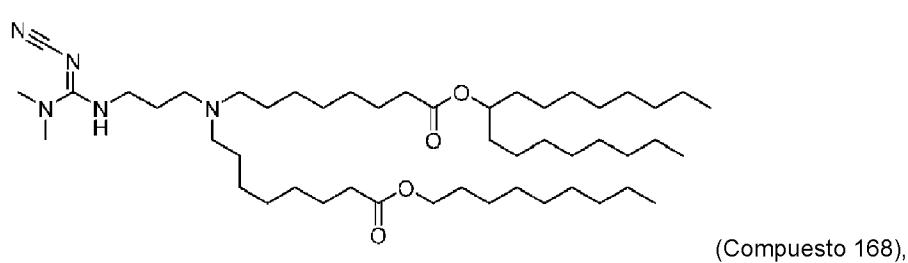
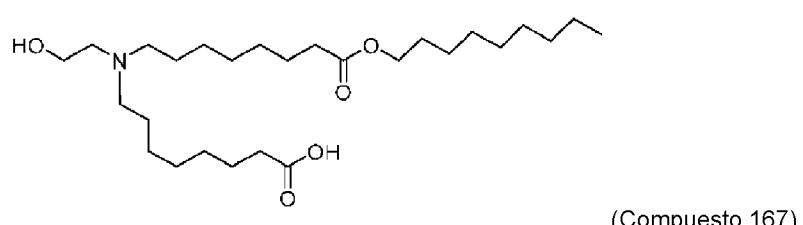
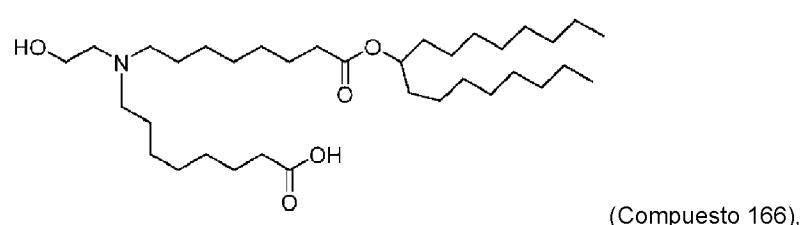
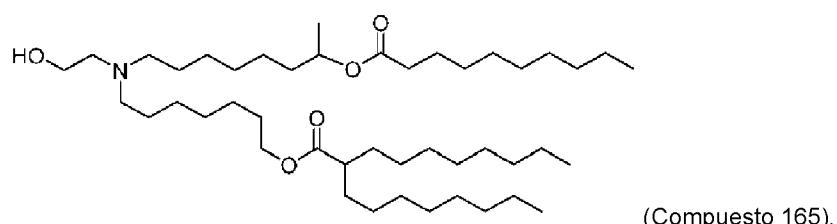
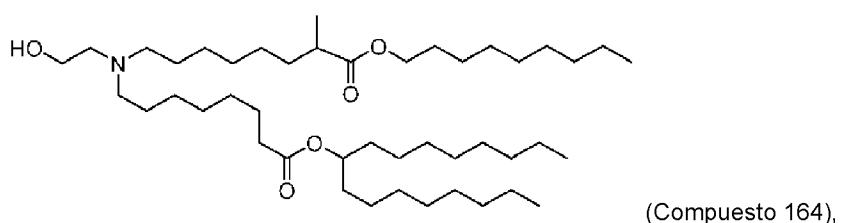
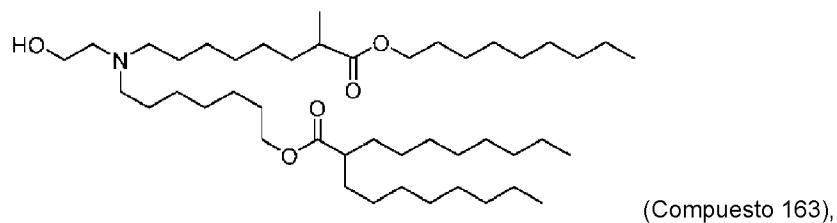
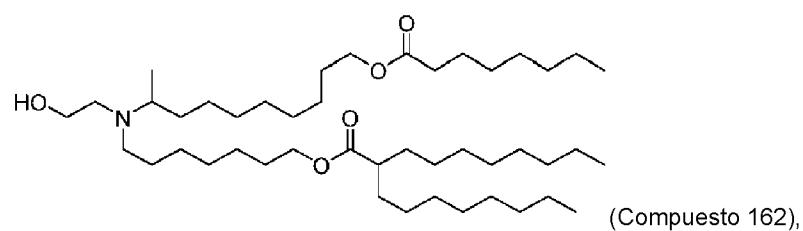


(Compuesto 160),

10

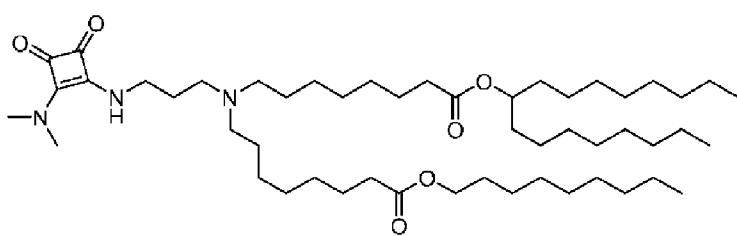


(Compuesto 161),

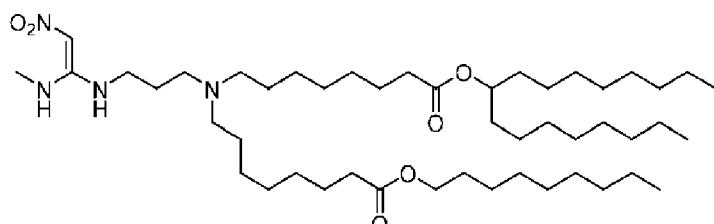


5

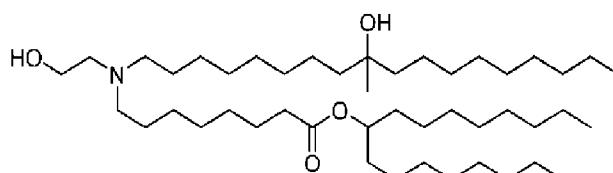
10



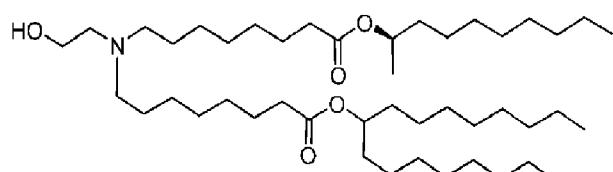
(Compuesto 169),



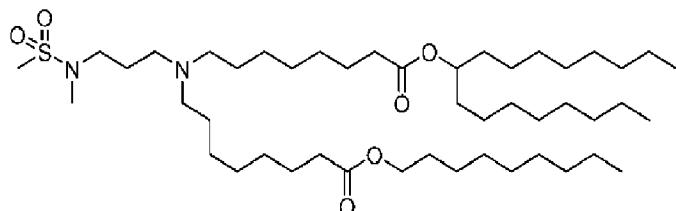
(Compuesto 170),



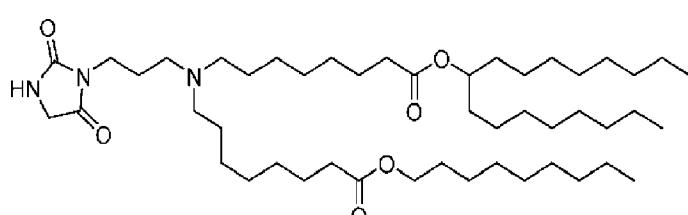
5 (Compuesto 171),



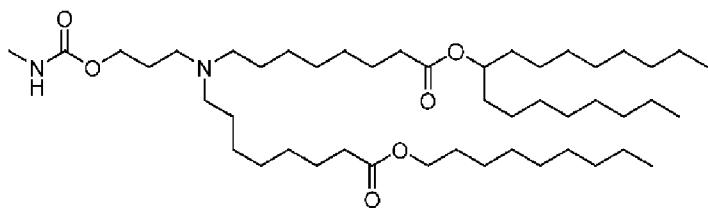
(Compuesto 172),



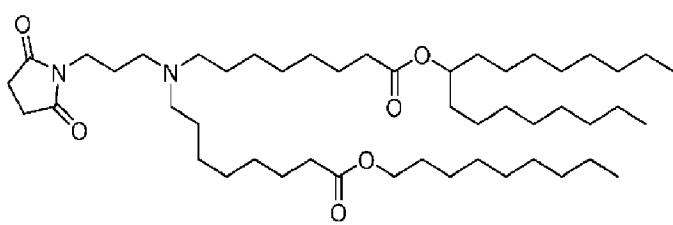
10 (Compuesto 173),



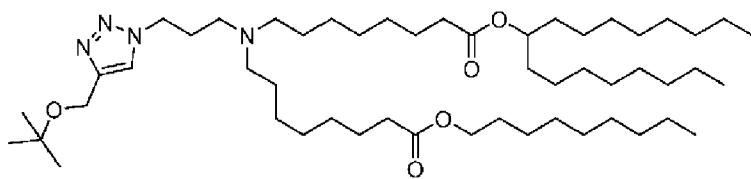
(Compuesto 174),



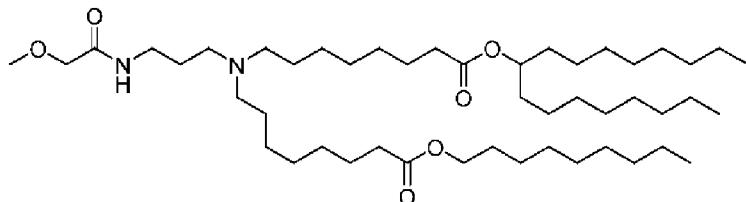
(Compuesto 175),



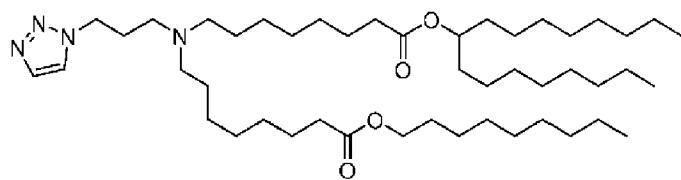
(Compuesto 176),



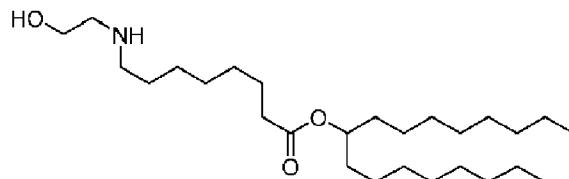
(Compuesto 177),



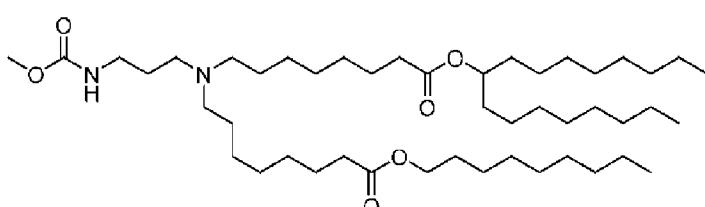
(Compuesto 178),



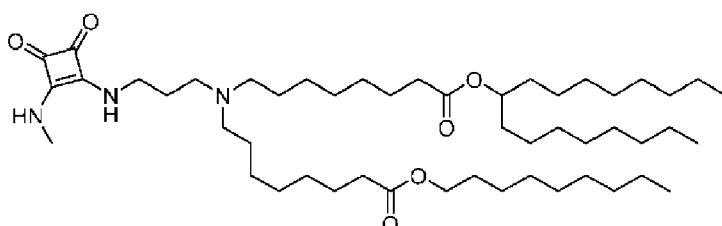
(Compuesto 179),



(Compuesto 180),



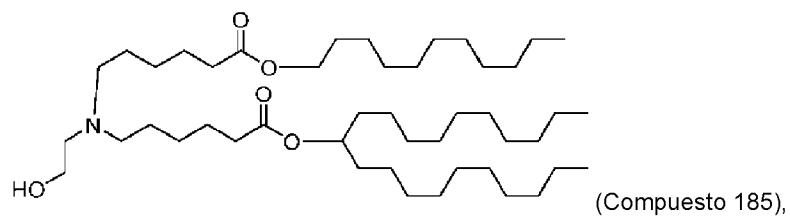
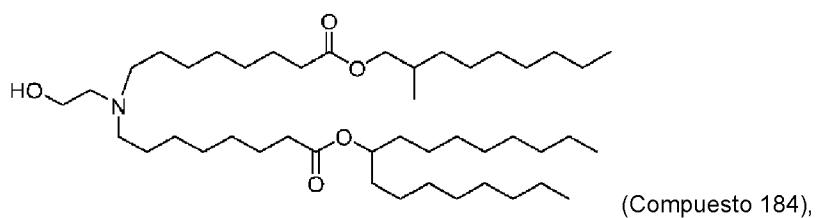
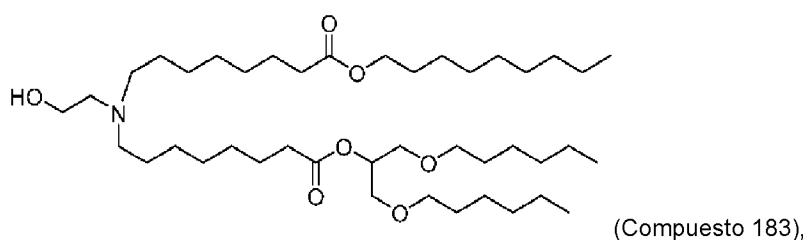
(Compuesto 181),



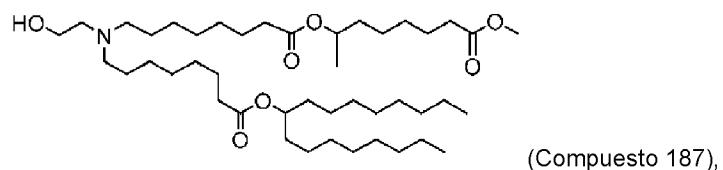
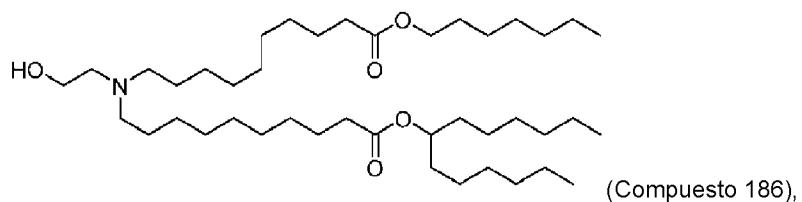
(Compuesto 182),

5

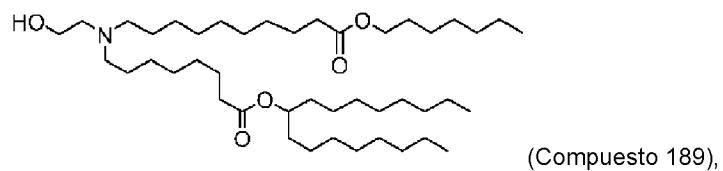
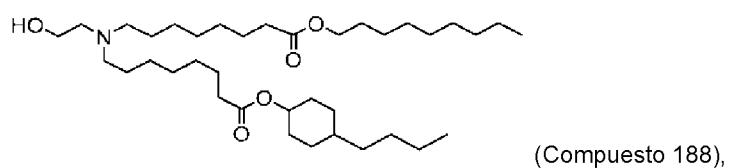
10



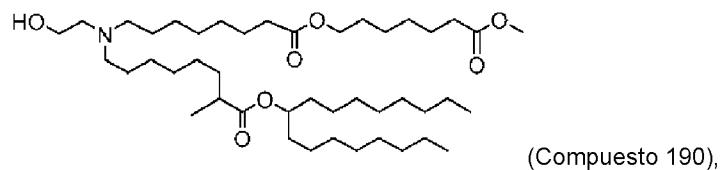
5

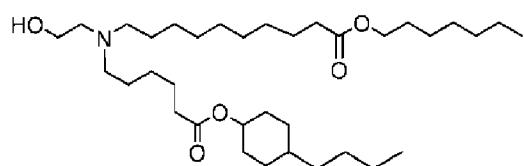


10

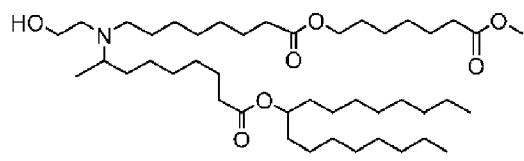


15

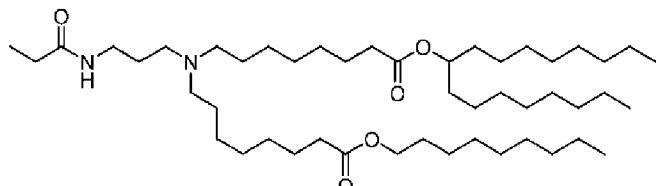




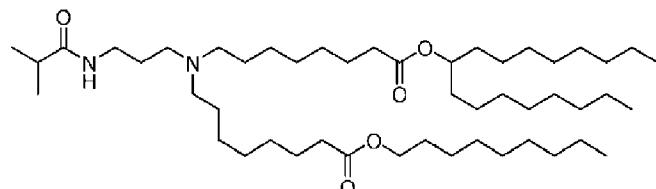
(Compuesto 191),



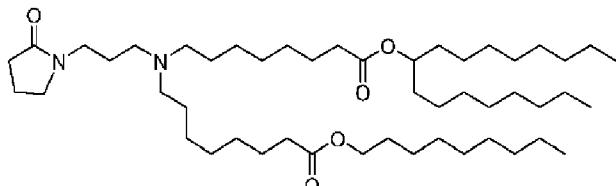
(Compuesto 192),



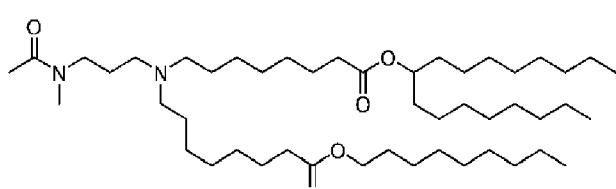
(Compuesto 193),



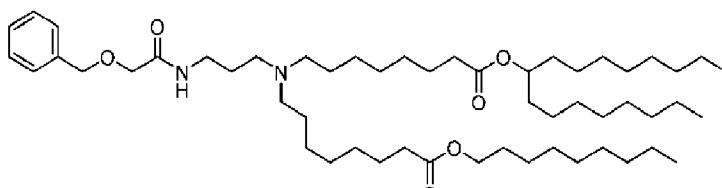
(Compuesto 194),



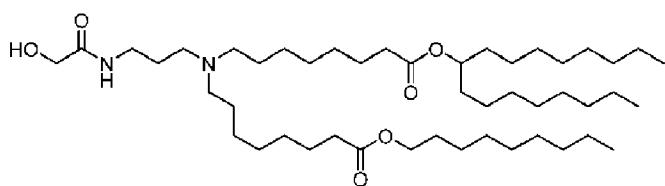
(Compuesto 195),



(Compuesto 196),



(Compuesto 197),

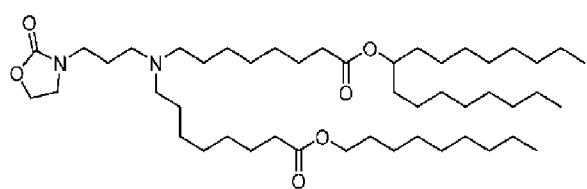


(Compuesto 198),

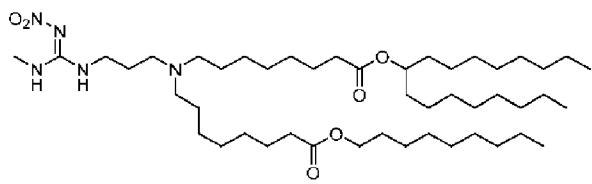
5

10

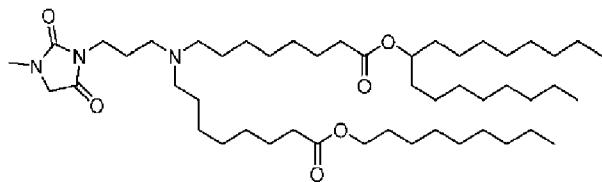
15



(Compuesto 199),

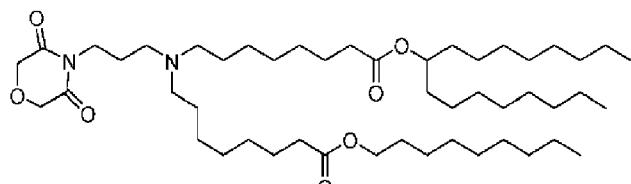


(Compuesto 200),

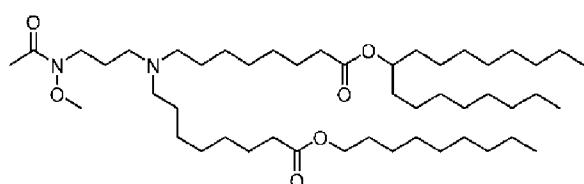


5

(Compuesto 201),

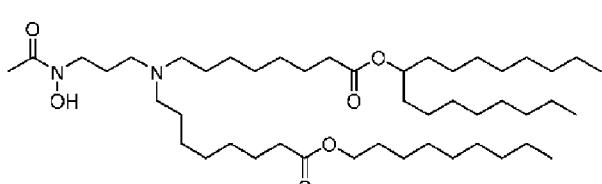


(Compuesto 202),

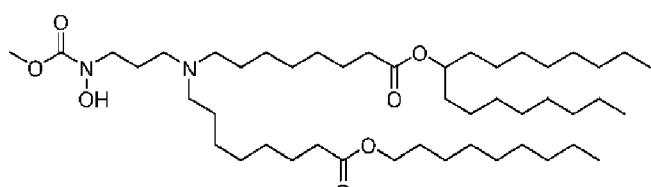


(Compuesto 203),

10

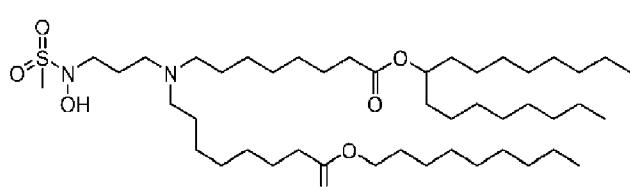


(Compuesto 204),

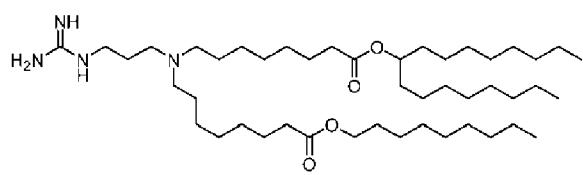


(Compuesto 205),

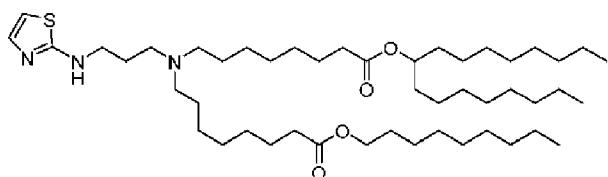
15



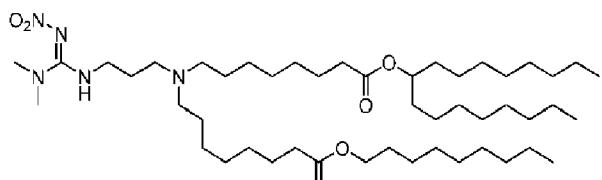
(Compuesto 206),



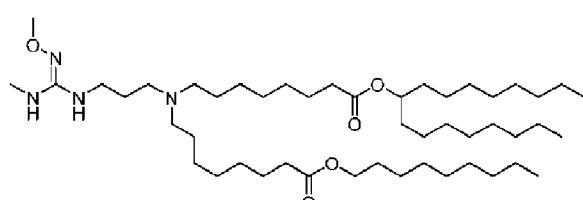
(Compuesto 207),



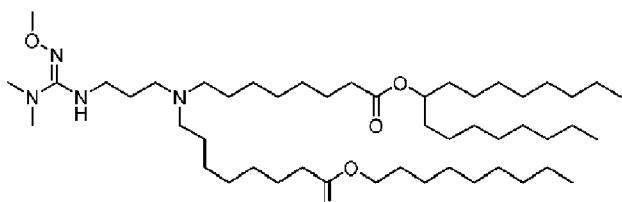
(Compuesto 208),



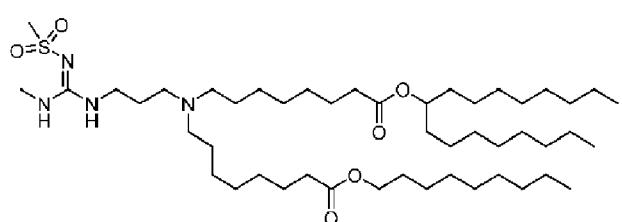
(Compuesto 209),



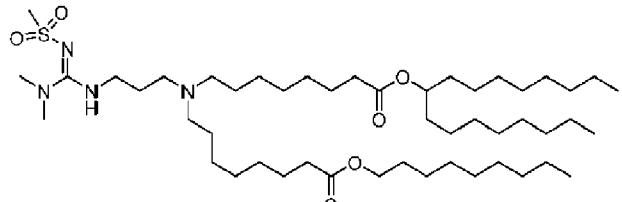
(Compuesto 210),



(Compuesto 211),



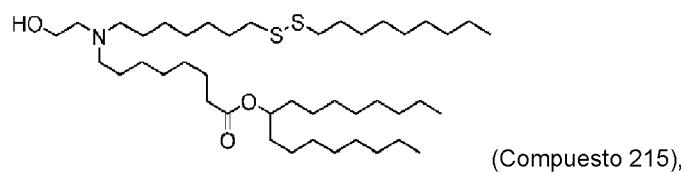
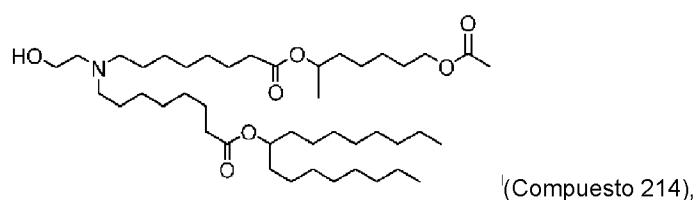
(Compuesto 212),



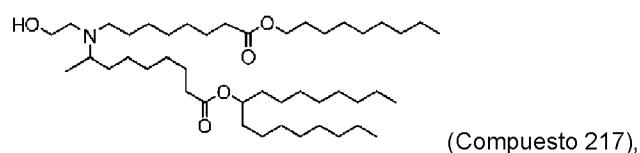
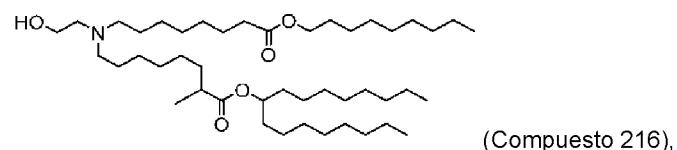
(Compuesto 213),

5

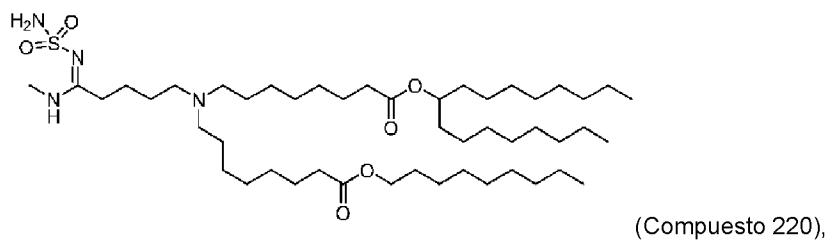
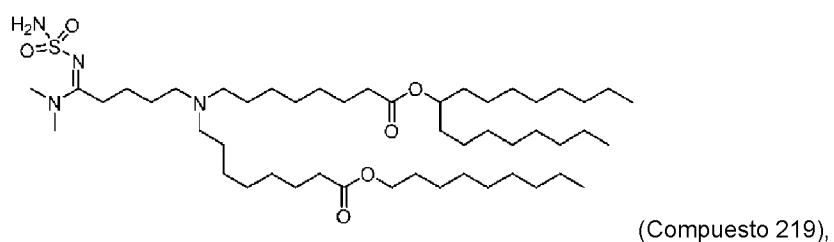
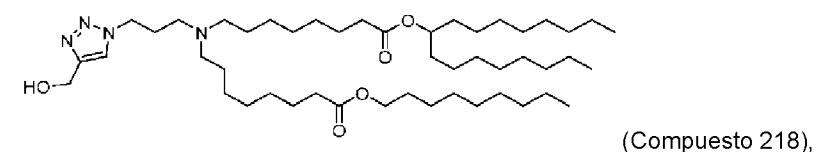
10



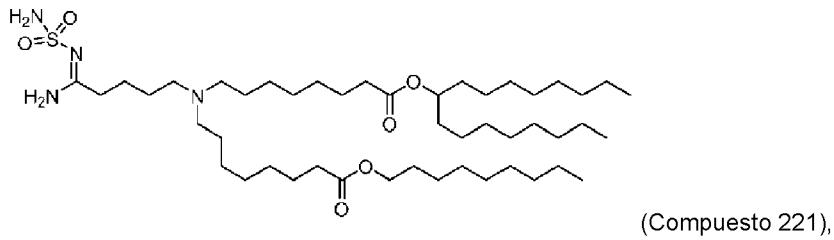
5

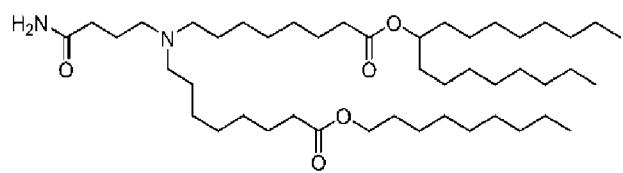


10

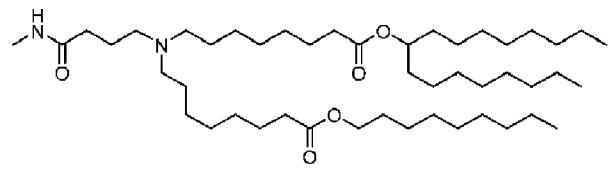


15

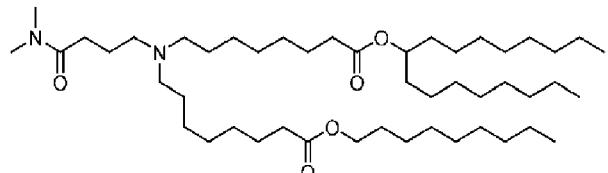




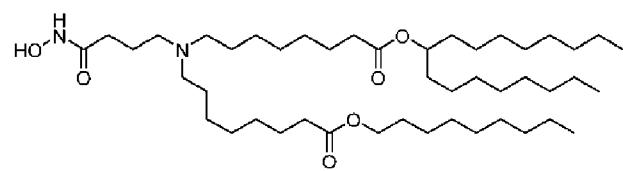
(Compuesto 222),



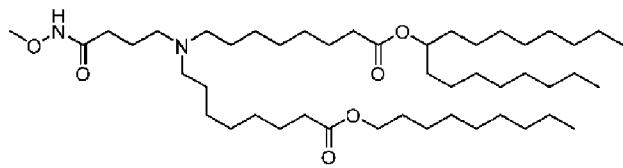
(Compuesto 223),



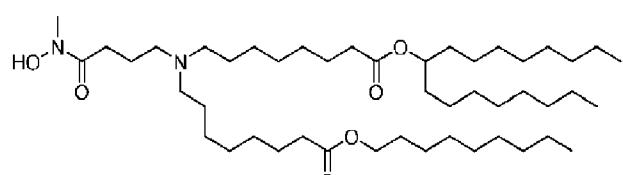
(Compuesto 224),



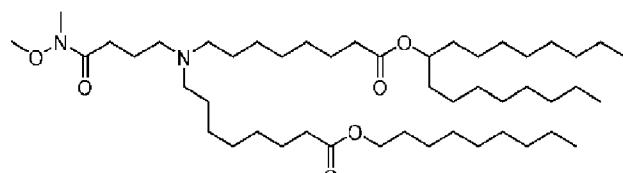
(Compuesto 225),



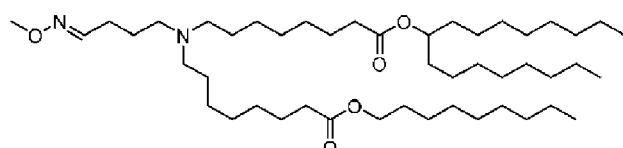
(Compuesto 226),



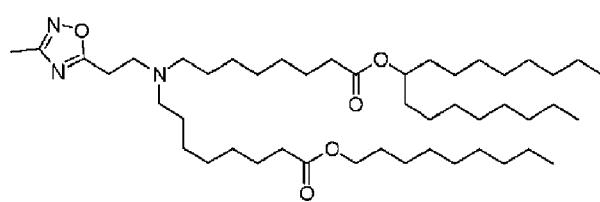
(Compuesto 227),



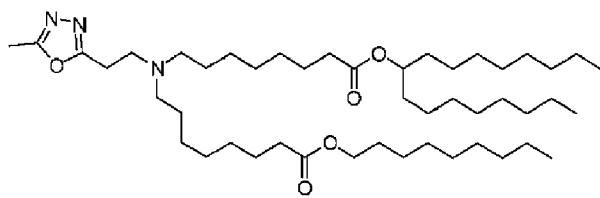
(Compuesto 228),



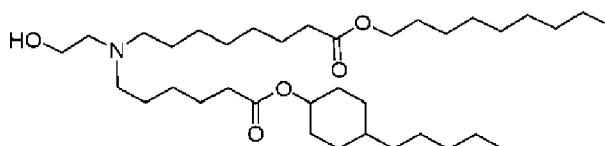
(Compuesto 229),



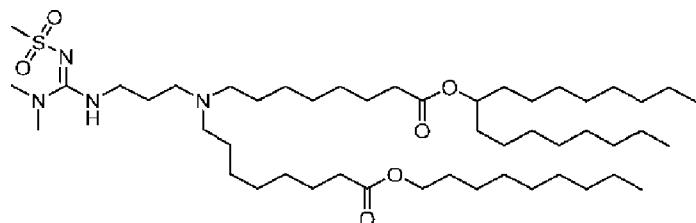
(Compuesto 230),



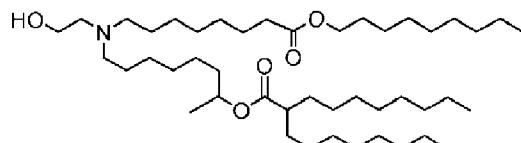
(Compuesto 231),



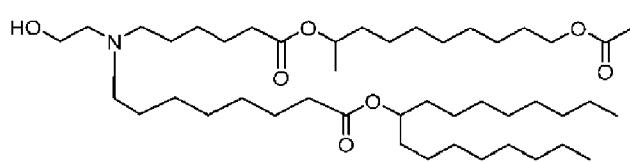
(Compuesto 232),



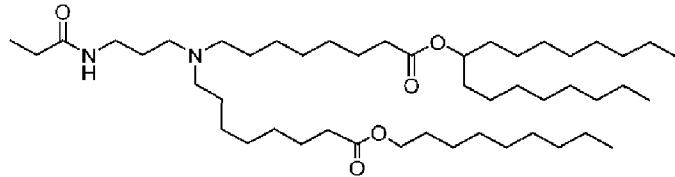
(Compuesto 233),



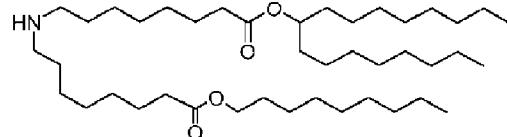
(Compuesto 234),



(Compuesto 235),



(Compuesto 236),

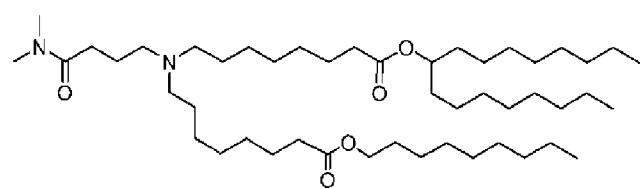


(Compuesto 237),

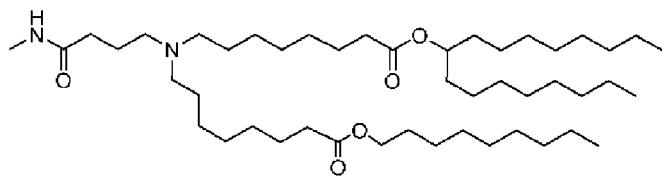
5

10

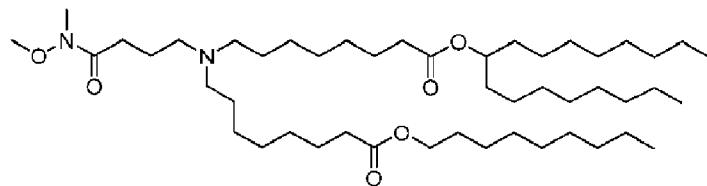
15



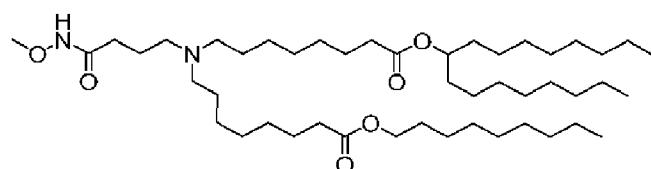
(Compuesto 238),



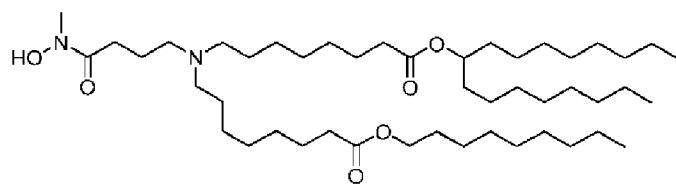
(Compuesto 239),



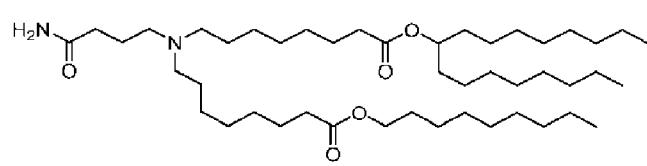
(Compuesto 240),



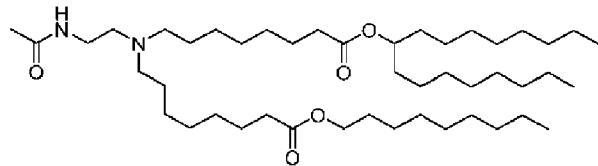
(Compuesto 241),



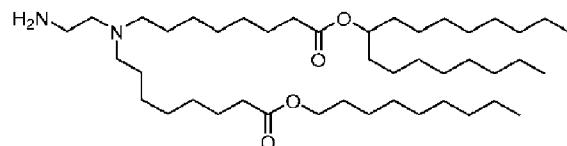
(Compuesto 242),



(Compuesto 243),



(Compuesto 244),

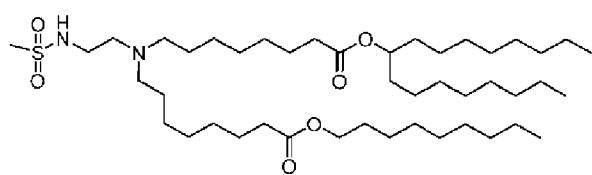


(Compuesto 245),

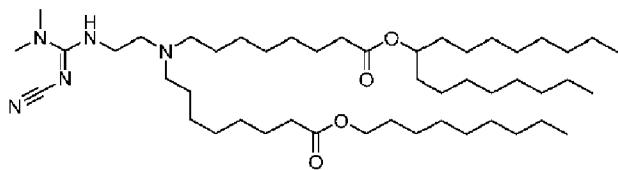
5

10

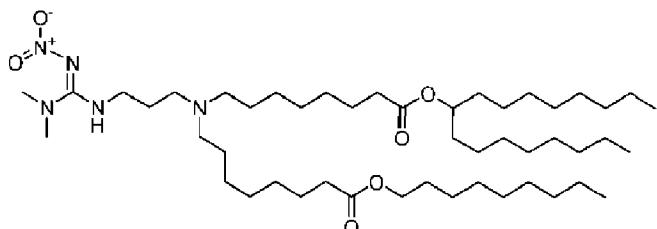
15



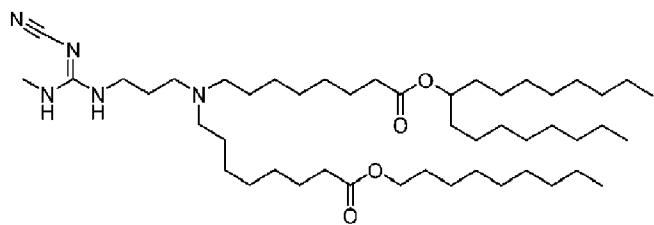
(Compuesto 246),



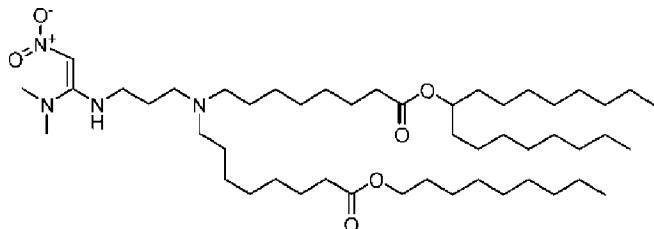
(Compuesto 247),



(Compuesto 248),

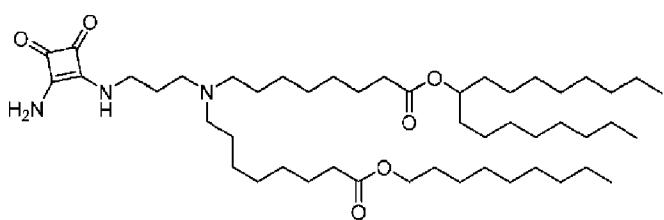


(Compuesto 249),

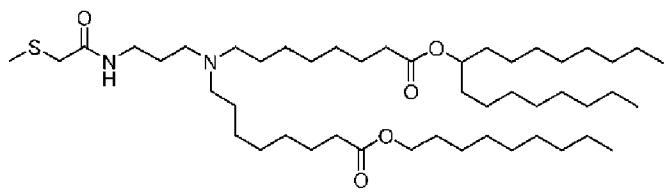


(Compuesto 250),

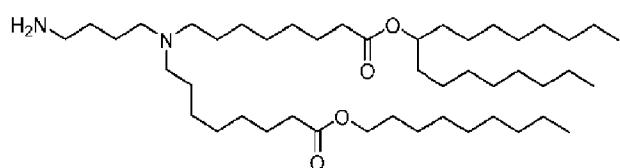
10



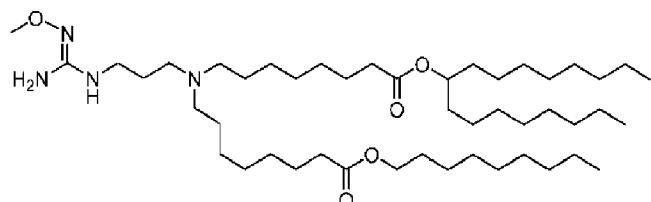
(Compuesto 251),



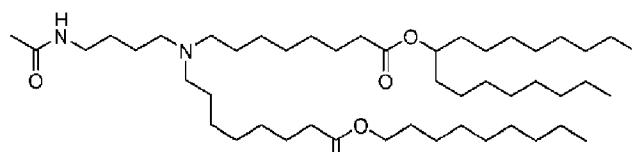
(Compuesto 252),



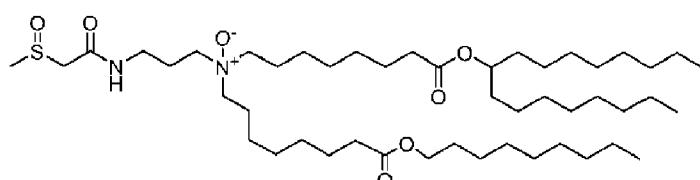
(Compuesto 253),



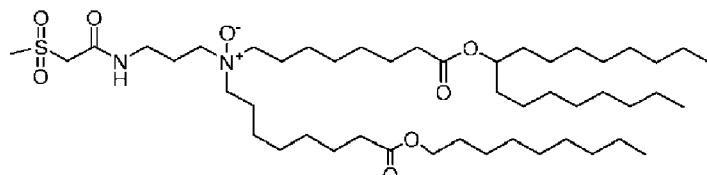
(Compuesto 254),



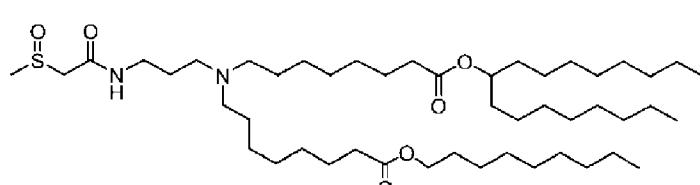
(Compuesto 255),



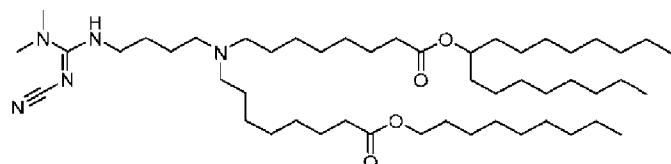
(Compuesto 256),



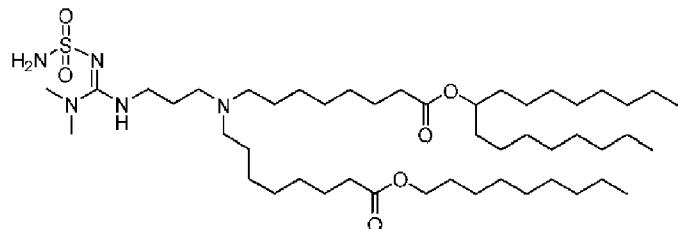
(Compuesto 257),



(Compuesto 258),



(Compuesto 259),

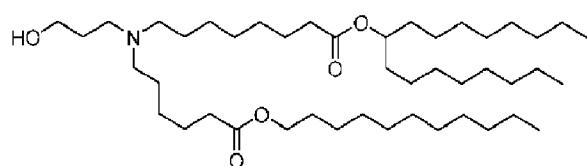


(Compuesto 260),

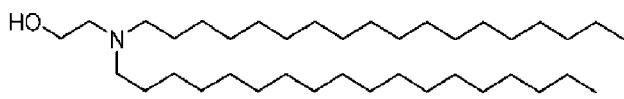
5

10

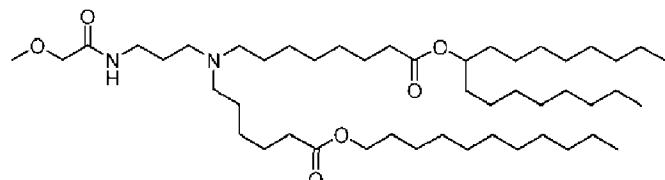
15



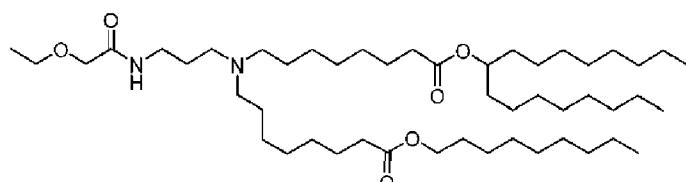
(Compuesto 261),



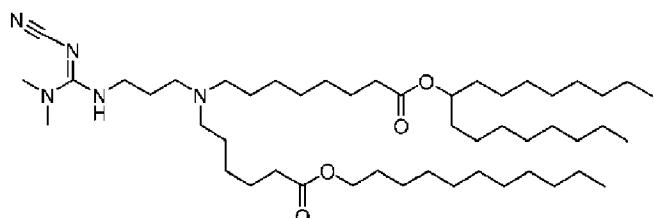
(Compuesto 262),



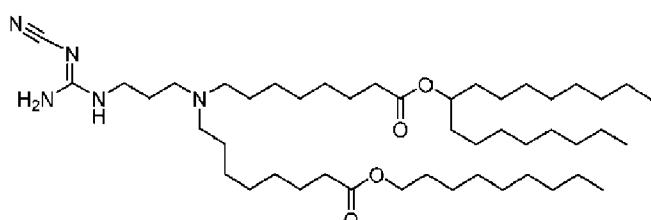
5 (Compuesto 263),



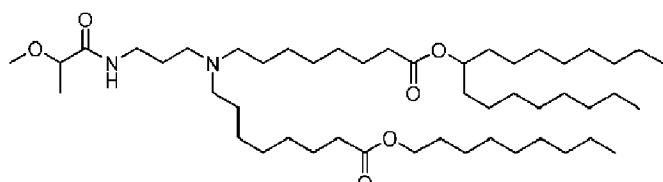
(Compuesto 264),



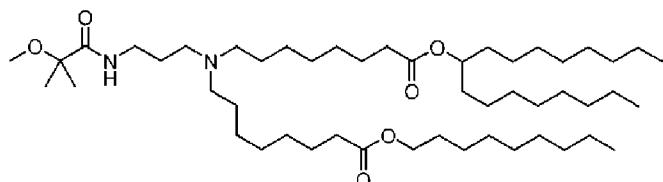
10 (Compuesto 265),



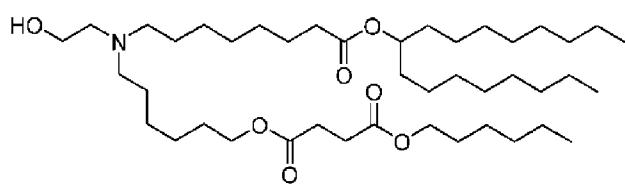
(Compuesto 266),



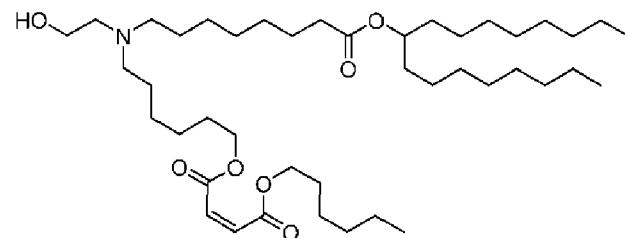
(Compuesto 267),



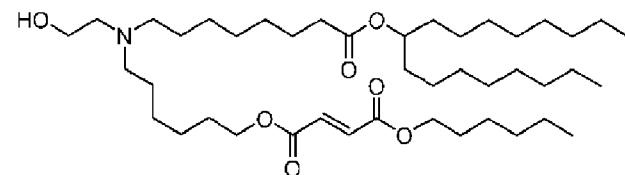
15 (Compuesto 268),



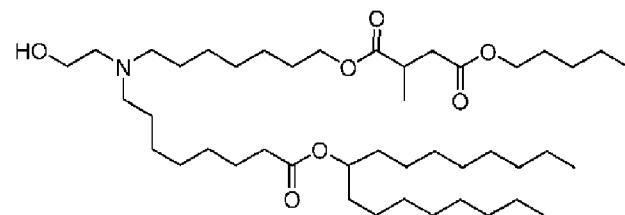
(Compuesto 269),



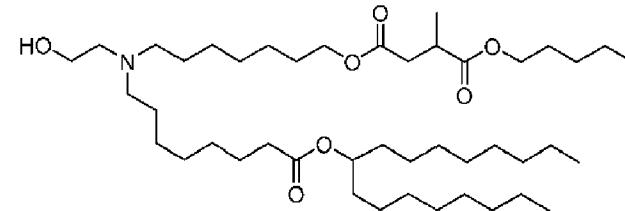
(Compuesto 270),



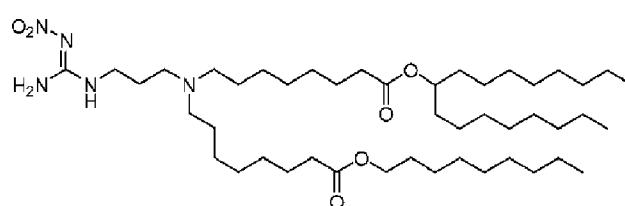
(Compuesto 271),



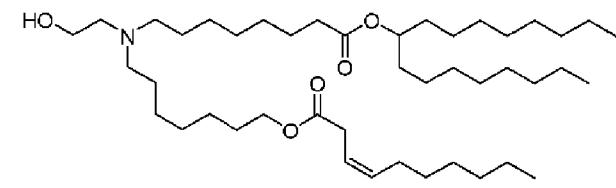
(Compuesto 272),



(Compuesto 273),



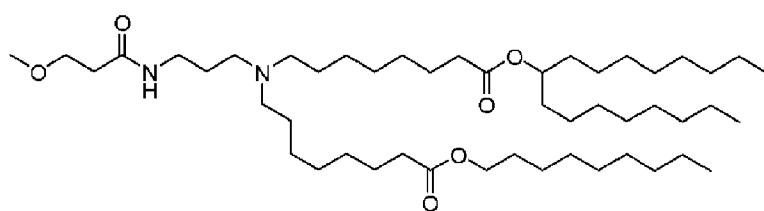
(Compuesto 274),



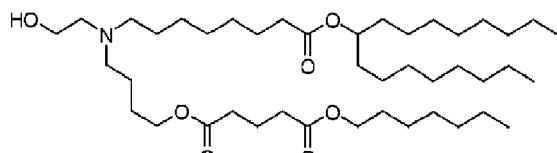
(Compuesto 275),

5

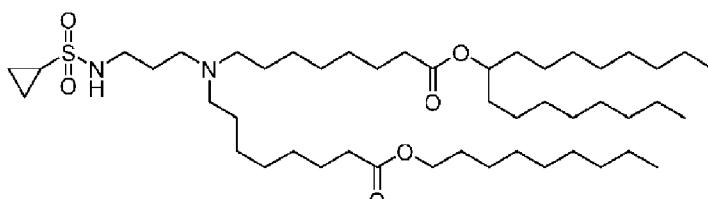
10



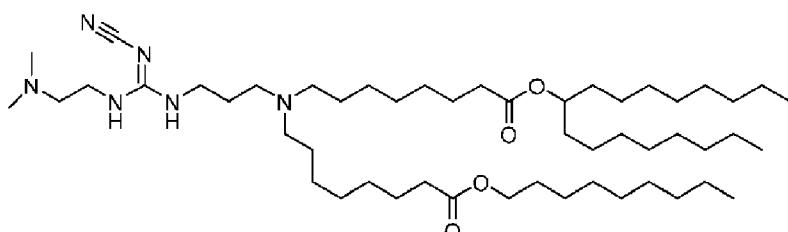
(Compuesto 276),



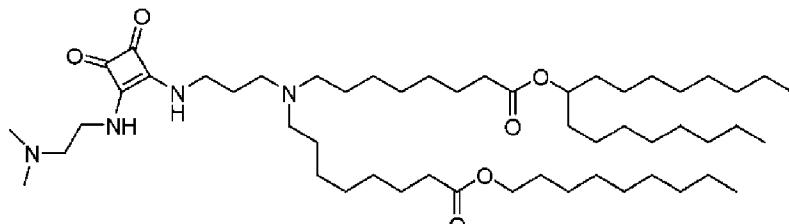
(Compuesto 277),



(Compuesto 278),



(Compuesto 279),



(Compuesto 280),

10

y sus N-óxidos, sales e isómeros.

El resto de amina central de un lípido según las fórmulas (I), (IA), (IB), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe), (IIf) o (IIg) puede estar protonada a pH fisiológico. Así, un lípido puede tener una carga positiva o parcialmente positiva a pH fisiológico. Dichos lípidos pueden denominarse (amino)lípidos catiónicos o ionizables. Los lípidos también pueden ser zwitteriónicos, es decir, moléculas neutras con carga positiva y negativa.

Como se usa en el presente documento, el término "alquilo", "grupo alquilo" o "alquileno" significa un hidrocarburo saturado lineal o ramificado que incluye uno o más átomos de carbono (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, catorce, quince, diecisésis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más átomos de carbono), que está opcionalmente sustituido. La notación "alquilo C₁₋₁₄" significa un hidrocarburo saturado, lineal o ramificado, opcionalmente sustituido que incluye 1-14 átomos de carbono. A menos que se especifique lo contrario, un grupo alquilo descrito en el presente documento se refiere tanto a grupos alquilo no sustituidos como sustituidos.

25

Como se usa en el presente documento, el término "alquenilo", "grupo alquenilo" o "alquenileno" significa un hidrocarburo lineal o ramificado que incluye dos o más átomos de carbono (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, quince, diecisésis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más átomos de carbono) y al menos un doble enlace, que está opcionalmente sustituido. La notación "alquenilo C₂₋₁₄" significa un hidrocarburo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que incluye 2-14 átomos de carbono y al menos un doble enlace carbono-carbono. Un grupo alquenilo puede incluir uno,

dos, tres, cuatro o más dobles enlaces carbono-carbono. Por ejemplo, el alquenilo C₁₈ puede incluir uno o más enlaces dobles. Un grupo alquenilo C₁₈ que incluye dos enlaces dobles puede ser un grupo linoleílo. A menos que se especifique lo contrario, un grupo alquenilo descrito en el presente documento se refiere tanto a grupos alquenilo no sustituidos como sustituidos.

Como se usa en el presente documento, el término "alquinilo", "grupo alquinilo" o "alquinileno" significa un hidrocarburo lineal o ramificado que incluye dos o más átomos de carbono (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más átomos de carbono) y al menos un triple enlace carbono-carbono, que está opcionalmente sustituido. La notación "alquinilo C₂₋₁₄" significa un hidrocarburo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que incluye 2-14 átomos de carbono y al menos un triple enlace carbono-carbono. Un grupo alquinilo puede incluir uno, dos, tres, cuatro o más triples enlaces carbono-carbono. Por ejemplo, el alquinilo C₁₈ puede incluir uno o más triples enlaces carbono-carbono. A menos que se especifique lo contrario, un grupo alquinilo descrito en el presente documento se refiere tanto a grupos alquinilo no sustituidos como sustituidos.

Como se usa en el presente documento, el término "carbociclo" o "grupo carbocíclico" significa un sistema mono o multicíclico opcionalmente sustituido que incluye uno o más anillos de átomos de carbono. Los anillos pueden ser de tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve o veinte miembros en los anillos. La notación "carbociclo C₃₋₆" significa un carbociclo que incluye un solo anillo que tiene 3-6 átomos de carbono. Los carbociclos pueden incluir uno o más dobles o triples enlaces carbono-carbono y pueden ser no aromáticos o aromáticos (por ejemplo, grupos cicloalquilo o arilo). Los ejemplos de carbociclos incluyen grupos ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, fenilo, naftilo y 1,2-dihidronaftilo. El término "cicloalquilo", como se usa en el presente documento, significa un carbociclo no aromático y puede incluir o no cualquier doble o triple enlace. A menos que se especifique lo contrario, los carbociclos descritos en el presente documento se refieren tanto a grupos carbociclo no sustituidos como sustituidos, es decir, carbociclos opcionalmente sustituidos.

Como se usa en el presente documento, el término "heterociclo" o "grupo heterocíclico" significa un sistema mono o multicíclico que incluye uno o más anillos, donde al menos un anillo incluye al menos un heteroárbolito. Los heteroárbolitos pueden ser, por ejemplo, átomos de nitrógeno, oxígeno o azufre. Los anillos pueden tener tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece o catorce miembros en el anillo. Los heterociclos pueden incluir uno o más dobles o triples enlaces y pueden ser no aromáticos o aromáticos (por ejemplo, grupos heterocicloalquilo o heteroarilo). Los ejemplos de heterociclos incluyen grupos imidazolilo, imidazolidinilo, oxazolilo, oxazolidinilo, tiazolilo, tiazolidinilo, pirazolidinilo, pirazolilo, isoxazolidinilo, isoxazolilo, isotiazolidinilo, isotiazolilo, morfolinilo, pirrolilo, pirrolidinilo, furilo, tetrahidrofurilo, tiofenilo, piridinilo, piperidinilo, quinolilo e isoquinolilo. El término "heterocicloalquilo", como se usa en el presente documento, significa un heterociclo no aromático y puede incluir o no cualquier doble o triple enlace. A menos que se especifique lo contrario, los heterociclos descritos en el presente documento se refieren tanto a grupos heterociclo no sustituidos como sustituidos, es decir, heterociclos opcionalmente sustituidos.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "heteroalquilo", "heteroalquenilo" o "heteroalquinilo" se refiere respectivamente a un grupo alquilo, alquenilo o alquinilo, tal como se define en el presente documento, que comprende además uno o más (*por ejemplo*, 1, 2, 3 o 4) heteroátomos (*por ejemplo*, oxígeno, azufre, nitrógeno, boro, silicio, fósforo) en el que uno o más heteroátomos se insertan entre átomos de carbono adyacentes dentro de la cadena de carbono padre y/o uno o más heteroátomos se insertan entre un átomo de carbono y la molécula madre, *es decir*, entre el punto de Unión. A menos que se especifique lo contrario, los heteroalquilos, heteroalquenilos o heteroalquinilos descritos en el presente documento se refieren tanto a heteroalquilos, heteroalquenilos o heteroalquinilos sustituidos como no sustituidos, es decir, heteroalquilos, heteroalquenilos o heteroalquinilos opcionalmente sustituidos.

Como se usa en el presente documento, un "grupo biodegradable" es un grupo que puede facilitar un metabolismo más rápido de un lípido en una entidad de mamífero. Un grupo biodegradable puede seleccionarse del grupo que consiste en, pero no se limita a, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(S)S-, -SC(S)-, -CH(OH)-, -P(O)(OR')O-, -S(O)₂-, un grupo arilo y un grupo heteroarilo. Como se usa en el presente documento, un "grupo arilo" es un grupo carbocíclico opcionalmente sustituido que incluye uno o más anillos aromáticos. Los ejemplos de grupos arilo incluyen grupos fenilo y naftilo. Como se usa en el presente documento, un "grupo heteroarilo" es un grupo heterocíclico opcionalmente sustituido que incluye uno o más anillos aromáticos. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen pirrolilo, furilo, tiofenilo, imidazolilo, oxazolilo y tiazolilo. Tanto los grupos arilo como heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos. Por ejemplo, M y M' pueden seleccionarse del grupo no limitante que consiste en fenilo, oxazol y tiazol opcionalmente sustituidos. En las fórmulas en el presente documento, M y M' pueden seleccionarse independientemente de la lista anterior de grupos biodegradables. A menos que se especifique lo contrario, los grupos arilo o heteroarilo descritos en el presente documento se refieren tanto a grupos no sustituidos como sustituidos, es decir, grupos arilo o heteroarilo opcionalmente sustituidos.

Los grupos alquilo, alquenilo y ciclico (por ejemplo, carbociclico y heterociclico) pueden estar opcionalmente sustituidos a menos que se especifique lo contrario. Los sustituyentes opcionales pueden seleccionarse del grupo que consiste en, pero no se limitan a, un átomo de halógeno (por ejemplo, un grupo cloruro, bromuro, fluoruro o yoduro), un ácido carboxílico (por ejemplo, -C(O)OH), un alcohol (por ejemplo, a hidroxilo, -OH), un éster (por ejemplo, -C(O)OR -OC(O)R), un aldehído (por ejemplo, -C(O)H), un carbonilo (por ejemplo, -C(O)R, representado alternativamente por C=O), un haluro de acilo (por ejemplo, -C(O)X, en el que X es un haluro seleccionado entre bromuro, fluoruro, cloruro y yoduro), un carbonato (por ejemplo, -OC(O)OR), un alkoxi (por ejemplo, -OR), un acetal (por ejemplo, -C(O)2R^{'''}, en el que cada OR son grupos alcoxi que pueden ser iguales o diferentes y R^{'''} es un grupo alquilo o alquenilo), un fosfato (por ejemplo, P(O)₄³⁻), un tiol (por ejemplo, -SH), un sulfóxido (por ejemplo, -S(O)R), un ácido sulfinico (por ejemplo, -S(O)OH), un ácido sulfónico (por ejemplo, -S(O)₂OH), un tial (por ejemplo, -C(S)H), un sulfato (por ejemplo, S(O)₄²⁻), un sulfonil (por ejemplo, -S(O)₂-), una amida (por ejemplo, -C(O)NR₂, o -N(R)C(O)R), un azido (por ejemplo, -N₃), un nitrógeno (por ejemplo, -NO₂), un ciano (por ejemplo, -CN), un isociano (por ejemplo, -NC), un aciloxi (por ejemplo, -OC(O)R), un amino (por ejemplo, -NR₂, -NRH, o -NH₂), a carbamoi (por ejemplo, -OC(O)NR₂, -OC(O)NRH, o -OC(O)NH₂), un sulfonamida (por ejemplo, -S(O)₂NR₂, -S(O)₂NRH, -S(O)₂NH₂, -N(R)S(O)₂R, -N(H)S(O)₂R, -N(R)S(O)₂H, o -N(H)S(O)₂H), un grupo alquilo, un grupo alquenilo y un grupo ciclico (por ejemplo, carbociclico o heterociclico). En cualquiera de los anteriores, R es un grupo alquilo o alquenilo, como se define en el presente documento. En algunas realizaciones, los propios grupos sustituyentes pueden estar sustituidos adicionalmente con, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis sustituyentes como se define en la presente memoria. Por ejemplo, 20 un grupo alquilo C₁₋₆ puede estar sustituido adicionalmente con uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis sustituyentes como se describe en la presente memoria.

Los compuestos de la descripción que contienen nitrógenos se pueden convertir en N-óxidos mediante tratamiento con un agente oxidante (por ejemplo, ácido 3-cloroperoxibenzoico (*m*CPBA) y/o peróxidos de hidrógeno) para producir otros compuestos de la descripción. Así, se considera que todos los compuestos que contienen nitrógeno mostrados y reivindicados, cuando lo permiten la valencia y la estructura, incluyen tanto el compuesto tal como se muestra como su derivado N-óxido (que puede designarse como N→O o N⁺O⁻). Además, en otros casos, los nitrógenos en los compuestos de la descripción se pueden convertir en compuestos N-hidroxi o N-alcoxi. Por ejemplo, los compuestos N-hidroxi pueden prepararse por oxidación de la amina original con un agente oxidante tal como *m*-CPBA. Todos los compuestos que contienen nitrógeno mostrados y reivindicados también se consideran, cuando lo permiten la valencia y la estructura, para cubrir tanto el compuesto como se muestra y su N-hidroxi (es decir, N-OH) y N-alcoxi (es decir, N-OR, en donde R es alquilo C_{1-C}6, alquenilo C_{1-C}6, alquinilo C_{1-C}6 sustituido o no sustituido, carbociclo de 3-14 miembros o heterociclo de 3-14 miembros).

Aproximadamente: Tal como se usa en esta invención, la expresión "aproximadamente" o "alrededor de", según se aplica a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia establecido. En determinadas realizaciones, el término "aproximado" o "aproximadamente" se refiere a un intervalo de valores que se encuentra dentro del 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, o menos en cualquier dirección (mayor que o menor que) del valor de referencia indicado, a menos que se indique lo contrario, o resulte evidente lo contrario a partir del contexto (salvo que dicho número supere 100 % de un valor posible). Por ejemplo, cuando se utiliza en el contexto de una cantidad de un compuesto dado en un componente lipídico de una composición de nanopartículas, "aproximadamente" puede significar +/- 10 % del valor mencionado. Por ejemplo, una composición de nanopartículas que incluye un componente lipídico que tiene aproximadamente un 40 % de un compuesto dado puede incluir entre un 30 y un 50 % del compuesto.

El término "compuesto" incluye todos los isómeros e isótopos de la estructura descrita. "Isótopos" se refiere a átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números másicos resultantes de un número diferente de neutrones en los núcleos. Por ejemplo, los isótopos del hidrógeno incluyen tritio y deuterio. Además, un compuesto, sal, o complejo de la presente divulgación puede prepararse en combinación con moléculas de solvente o agua para formar solvatos e hidratos mediante métodos rutinarios.

Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "poner en contacto" significa establecer una conexión física entre dos o más entidades. Por ejemplo, poner en contacto una célula de mamífero con una composición de nanopartículas significa que la célula de mamífero y una nanopartícula están hechas para compartir una conexión física. Los métodos para poner en contacto células con entidades externas tanto *in vivo* como *ex vivo* son bien conocidos en las técnicas biológicas. Por ejemplo, el contacto de una composición de nanopartículas y una célula de mamífero dispuesta dentro de un mamífero puede realizarse por varias vías de administración (por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intradérmica y subcutánea) y puede implicar cantidades variadas de composiciones de nanopartículas. Además, más de una célula de mamífero puede ponerse en contacto con una composición de nanopartículas.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "administrar" significa proporcionar una entidad a un destino. Por ejemplo, la administración de un fármaco terapéutico y/o profiláctico a un sujeto puede implicar la administración de una composición de nanopartículas que incluya el fármaco terapéutico y/o profiláctico al

sujeto (*por ejemplo*, por vía intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intratumoral o subcutánea). La administración de una composición de nanopartículas a un mamífero o célula de mamífero puede implicar poner en contacto una o más células con la composición de nanopartículas.

- 5 Como se usa en el presente documento, el término "administración mejorada" significa la administración de más (*por ejemplo*, al menos 1.5 veces más, al menos 2 veces más, al menos 3 veces más, al menos 4 veces más, al menos 5 veces más, al menos 6 veces más, al menos 7 veces más, al menos 8 veces más, al menos 9 veces más, al menos 10 veces más) de un terapéutico y/o profiláctico por una nanopartícula a un tejido diana de interés (*por ejemplo*, hígado de mamífero) en comparación con el nivel de administración de un terapéutico y/o profiláctico por una nanopartícula de control a un tejido diana de interés (*por ejemplo*, MC3, KC2 o DLinDMA). El nivel de suministro de una nanopartícula a un tejido concreto puede medirse comparando la cantidad de proteína producida en un tejido con el peso de dicho tejido, comparando la cantidad de terapéutico y/o profiláctico en un tejido con el peso de dicho tejido, comparando la cantidad de proteína producida en un tejido con la cantidad de proteína total en dicho tejido, o comparando la cantidad de terapéutico y/o profiláctico en un tejido con la cantidad de terapéutico y/o profiláctico total en dicho tejido. Se entenderá que la administración potenciada de una nanopartícula a un tejido diana no necesita determinarse en un sujeto que se está tratando, puede determinarse en un sustituto tal como un modelo animal (*por ejemplo*, un modelo de rata). En ciertas realizaciones, una composición de nanopartículas que incluye un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I), (IA), (IB), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe), (IIf) o (IIg) tiene sustancialmente el mismo nivel de mejora de la administración independientemente de las vías de administración. Por ejemplo, ciertos compuestos descritos en el presente documento presentan una mejora de administración similar cuando se utilizan para administrar un agente terapéutico y/o profiláctico por vía intravenosa o intramuscular. En otras realizaciones, ciertos compuestos descritos en el presente documento (*por ejemplo*, un compuesto de Fórmula (IA) o (II), tal como el Compuesto 18, 25, 30, 60, 108-112 o 122) presentan un mayor nivel de mejora de la administración cuando se usan para administrar un agente terapéutico y/o profiláctico por vía intramuscular que por vía intravenosa.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "administración específica", "administrar específicamente" o "que administra específicamente" se refiere a la administración de más (*por ejemplo*, al menos 1.5 veces más, al menos 2 veces más, al menos 3 veces más, al menos 4 veces más, al menos 5 veces más, al menos 6 veces más, al menos 7 veces más, al menos 8 veces más, al menos 9 veces más, al menos 10 veces más) de un terapéutico y/o profiláctico por una nanopartícula a un tejido diana de interés (*por ejemplo*, hígado de mamífero) en comparación con un tejido no diana (*por ejemplo*, bazo de mamífero). El nivel de suministro de una nanopartícula a un tejido concreto puede medirse comparando la cantidad de proteína producida en un tejido con el peso de dicho tejido, comparando la cantidad de terapéutico y/o profiláctico en un tejido con el peso de dicho tejido, comparando la cantidad de proteína producida en un tejido con la cantidad de proteína total en dicho tejido, o comparando la cantidad de terapéutico y/o profiláctico en un tejido con la cantidad de terapéutico y/o profiláctico total en dicho tejido. Por ejemplo, para la orientación renovascular, un fármaco terapéutico y/o profiláctico se administra específicamente a un riñón de mamífero en comparación con el hígado y el bazo si se administra 1.5, 2, 3, 5, 10, 15 o 20 veces más fármaco terapéutico y/o profiláctico por 1 g de tejido a un riñón en comparación con el administrado al hígado o al bazo tras la administración sistémica del fármaco terapéutico y/o profiláctico. Se entenderá que la capacidad de administrar específicamente una nanopartícula a un tejido diana no necesita determinarse en un sujeto que se está tratando, puede determinarse en un sustituto tal como un modelo animal (*por ejemplo*, un modelo de rata).

45 Como se utiliza en el presente documento, "eficacia de encapsulación" se refiere a la cantidad de un agente terapéutico y/o profiláctico que se convierte en parte de una composición de nanopartículas, en relación con la cantidad total inicial de agente terapéutico y/o profiláctico utilizado en la preparación de una composición de nanopartículas. Por ejemplo, si se encapsulan 97 mg de terapéutico y/o profiláctico en una composición de nanopartículas de un total de 100 mg de terapéutico y/o profiláctico aportados inicialmente a la composición, la eficacia de encapsulación puede darse como del 97 %. Tal y como se usa en la presente memoria, "encapsulación" puede referirse a un encierro, confinamiento, entorno o encapsulamiento completo, sustancial o parcial.

55 Tal como se utiliza aquí, la "expresión" de una secuencia de ácido nucleico se refiere a la traducción de un ARNm en un polipéptido o proteína y/o a la modificación postraduccional de un polipéptido o proteína.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "in vitro" se refiere a acontecimientos que tienen lugar en un entorno artificial, *por ejemplo*, en un tubo de ensayo o recipiente de reacción, en un cultivo celular, en una placa de Petri, etc., en lugar de dentro de un organismo (*por ejemplo*, animal, vegetal o microbio).

Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "in vivo" se refiere a acontecimientos que ocurren dentro de un organismo (*por ejemplo*, un animal, una planta o un microbio o una célula o tejido del mismo).

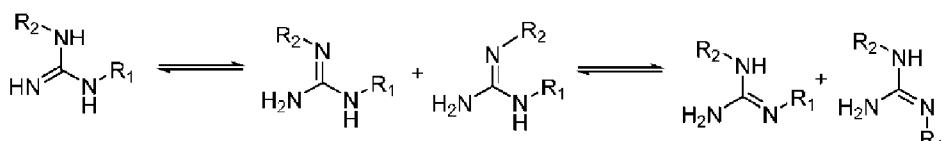
65 Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "ex vivo" se refiere a acontecimientos que ocurren fuera de un organismo (*por ejemplo*, un animal, una planta, un microbio o una célula o tejido del mismo). Los

eventos ex vivo pueden tener lugar en un entorno mínimamente alterado de un entorno natural (*por ejemplo*, in vivo).

- 5 Tal como se utiliza aquí, el término "isómero" significa cualquier isómero geométrico, tautómero, zwitterión, estereoisómero, enantiómero o diastereómero de un compuesto. Los compuestos pueden incluir uno o más centros quirales y/o dobles enlaces y, por lo tanto, existen como estereoisómeros, tales como isómeros de doble enlace (es decir, isómeros geométricos E/Z) o diastereómeros (*por ejemplo*, enantiómeros (es decir, (+) o (-)) o isómeros *cis/trans*). La presente divulgación abarca cualquiera y todos los estereoisómeros de los compuestos descritos en el presente documento, incluyendo las formas estereomericamente puras (*por ejemplo*, geométricamente pura, enantioméricamente pura o diastereomericamente pura) y las mezclas enantioméricas y estereoisoméricas, *por ejemplo*, racematos. Las mezclas enantioméricas y estereoméricas de compuestos y los medios para resolverlas en sus enantiómeros o estereoisómeros componentes son bien conocidas.
- 10 15 "Tautómero" es uno de dos o más isómeros estructurales que existen en equilibrio y se convierte fácilmente de una forma isomérica a otra. Esta conversión da como resultado la migración formal de un átomo de hidrógeno acompañada de un cambio de enlaces dobles conjugados adyacentes. Los tautómeros existen como una mezcla de un conjunto tautomérico en solución. En soluciones donde es posible la tautomerización, se alcanzará un equilibrio químico de los tautómeros. La proporción exacta de los tautómeros depende de varios factores, entre ellos la temperatura, el disolvente y el pH. El concepto de tautómeros que son interconvertibles por tautomerización se denomina tautomería.

20 De los diversos tipos de tautomería que son posibles, se observan comúnmente dos. En la tautomería ceto-enólica se produce un desplazamiento simultáneo de electrones y de un átomo de hidrógeno. La tautomería de cadena anular surge como resultado de la reacción del grupo aldehído (-CHO) en una molécula de cadena de azúcar con uno de los grupos hidroxi (-OH) en la misma molécula para darle una forma cíclica (en forma de anillo) como la que presenta la glucosa.

25 30 Los pares tautoméricos comunes son: tautomería de cetona-enol, amida-nitrilo, lactama-lactima, amida-ácido imídico en anillos heterocíclicos (*por ejemplo*, en nucleobases como guanina, timina y citosina), imina-enamina y enamina-enamina. A continuación se muestra un ejemplo de tautomería en guanidina disustituida.



35 40 Se debe entender que los compuestos de la divulgación pueden representarse como diferentes tautómeros. También debe entenderse que cuando los compuestos tienen formas tautoméricas, se pretende que todas las formas tautoméricas estén incluidas en el alcance de la divulgación, y la denominación de los compuestos no excluye ninguna forma tautómera.

45 50 Como se utiliza en el presente documento, un "componente lipídico" es aquel componente de una composición de nanopartículas que incluye uno o más lípidos. Por ejemplo, el componente lipídico puede incluir uno o más lípidos catiónicos/ionizables, PEGilados, estructurales u otros, tales como los fosfolípidos.

55 60 Como se utiliza en el presente documento, un "enlazador" es un resto que conecta dos restos, por ejemplo, la conexión entre dos nucleósidos de una especie de casquete. Un enlazador puede incluir uno o más grupos que incluyen, pero no se limitan a, grupos fosfato (*por ejemplo*, fosfatos, boranofosfatos, tiofosfatos, selenofosfatos y fosfonatos), grupos alquilo, amidatos o gliceroles. Por ejemplo, dos nucleósidos de un análogo de casquete pueden estar unidos en sus posiciones 5' por un grupo trifosfato o por una cadena que incluye dos restos de fosfato y un resto de boranofosfato.

Tal como se utiliza en el presente documento, los "métodos de administración" pueden incluir métodos intravenosos, intramusculares, intradérmicos, subcutáneos u otros métodos de administración de una composición a un sujeto. Se puede seleccionar un método de administración para dirigir la administración (*por ejemplo*, para administrar específicamente) a una región o sistema específico de un cuerpo.

Tal como se utiliza en el presente documento, "modificado" significa no natural. Por ejemplo, un ARN puede ser un ARN modificado. Es decir, un ARN puede incluir una o más nucleobases, nucleósidos, nucleótidos o enlazadores no naturales. Una especie "modificada" también puede denominarse en el presente documento especie "alterada". Las especies pueden modificarse o alterarse química, estructural o funcionalmente. Por ejemplo, una especie de nucleobase modificada puede incluir una o más sustituciones que no ocurren naturalmente.

Como se utiliza en el presente documento, la "relación N:P" es la relación molar de átomos de nitrógeno ionizables (en el intervalo de pH fisiológico) en un lípido a grupos fosfato en un ARN, *por ejemplo*, en una composición de nanopartículas que incluye un componente lipídico y un ARN.

- 5 Como se utiliza en el presente documento, una "composición de nanopartículas" es una composición que comprende uno o más lípidos. Las composiciones de nanopartículas suelen tener un tamaño del orden de micrómetros o menor y pueden incluir una bicapa lipídica. Las composiciones de nanopartículas abarcan nanopartículas lipídicas (LNP), liposomas (por ejemplo, vesículas lipídicas) y lipoplejos. Por ejemplo, una composición de nanopartículas puede ser un liposoma que tenga una bicapa lipídica con un diámetro de 500
10 nm o menos.

Tal y como se utiliza en el presente documento, "natural" significa que existe en la naturaleza sin ayuda artificial.

- 15 Tal y como se utiliza en el presente documento, "paciente" se refiere a un sujeto que puede buscar o necesitar tratamiento, requiere tratamiento, está recibiendo tratamiento, recibirá tratamiento, o un sujeto que está bajo el cuidado de un profesional capacitado para una enfermedad o afección en particular.

- 20 Como se utiliza en el presente documento, un "lípido PEG" o "lípido PEGilado" se refiere a un lípido que comprende un componente de polietilenglicol.

- 25 La frase "farmacéuticamente aceptable" se utiliza en el presente documento para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del ámbito del buen juicio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable

- 30 La frase "excipiente farmacéuticamente aceptable", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier ingrediente distinto de los compuestos descritos en el presente documento (por ejemplo, un vehículo capaz de suspender, complejar o disolver el compuesto activo) y que tenga las propiedades de ser sustancialmente no tóxico y no inflamatorio en un paciente. Los excipientes pueden incluir, por ejemplo: antiadherentes, antioxidantes, aglutinantes, recubrimientos, ayudas a la compresión, desintegrantes, tintes (colores), emolientes, emulsionantes, cargas (diluyentes), formadores de película o recubrimientos, sabores, fragancias, deslizantes (potenciadores del flujo), lubricantes, conservantes, tintas de impresión, absorbentes, agentes de suspensión o dispersión, edulcorantes y aguas de hidratación. Los excipientes ejemplares incluyen, pero no se limitan a: hidroxitolueno butilado (BHT), carbonato cálcico, fosfato cálcico (dibásico), estearato cálcico, croscarmelosa, polivinilpirrolidona reticulada, ácido cítrico, crospovidona, cisteína, etilcelulosa, gelatina, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetylcelulosa, lactosa, estearato de magnesio, maltitol, manitol, metionina, metilcelulosa, metilparabeno, celulosa microcristalina, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, povidona, 40 almidón pregelatinizado, propilparabeno, palmitato de retinilo, goma laca, dióxido de silicio, carboximetilcelulosa sódica, citrato sódico, almidón glicolato sódico, sorbitol, almidón (maíz), ácido esteárico, sacarosa, talco, dióxido de titanio, vitamina A, vitamina E (alfa-tocoferol), vitamina C, xilitol y otras especies descritas en el presente documento.

- 45 En la presente especificación, la fórmula estructural del compuesto representa un cierto isómero para conveniencia en algunos casos, pero la presente divulgación incluye todos los isómeros, tales como isómeros geométricos, isómeros ópticos basados en un carbono asimétrico, estereoisómeros, tautómeros y similares, entendiéndose que no todos los isómeros pueden tener el mismo nivel de actividad. Además, puede estar presente un polimorfismo cristalino para los compuestos representados por la fórmula. Se observa que cualquier forma cristalina, mezcla de formas cristalinas o anhídrido o hidrato de los mismos está incluido en el alcance de la presente divulgación.

- 55 El término "polimorfos cristalinos", "polimorfos" o "formas cristalinas" significa estructuras cristalinas en las que un compuesto (o una sal o solvato del mismo) puede cristalizar en diferentes disposiciones de empaquetamiento de cristales, todas las cuales tienen la misma composición elemental. Las distintas formas cristalinas suelen tener diferentes patrones de difracción de rayos X, espectros infrarrojos, puntos de fusión, dureza de densidad, forma cristalina, propiedades ópticas y eléctricas, estabilidad y solubilidad. El disolvente de recristalización, la velocidad de cristalización, la temperatura de almacenamiento y otros factores pueden hacer que domine una forma cristalina. Los polimorfos cristalinos de los compuestos se pueden preparar mediante cristalización en diferentes condiciones.

- 60 Las composiciones también pueden incluir sales de uno o más compuestos. Las sales pueden ser sales farmacéuticamente aceptables. Tal como se utiliza en el presente documento, "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos divulgados en los que el compuesto original se altera mediante la conversión de una fracción de ácido o base existente a su forma de sal (*por ejemplo*, mediante la reacción de un grupo base libre con un ácido orgánico adecuado). Los ejemplos de sales farmacéuticamente

aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos minerales u orgánicos de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales de adición ácida representativas incluyen sales de acetato, adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, canforato, canforsulfonato, citrato, 5 ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidroxibromuro, hidroxicloruro, hidroyoduro, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, sulfato de laurilo, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 10 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, toluenosulfonato, undecanoato, valerato y similares. Las sales representativas de metales alcalinos o 15 alcalinotérreos incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares, así como también cationes de amonio, amonio cuaternario y amina no tóxicos, incluyendo, entre otros, amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente descripción incluyen las sales no tóxicas convencionales del compuesto precursor formadas, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Las sales farmacéuticamente 20 aceptables de la presente descripción se pueden sintetizar a partir del compuesto principal que contiene un resto ácido o básico mediante procedimientos químicos convencionales. Generalmente, dichas sales pueden prepararse haciendo reaccionar las formas de ácido o base libre de estos compuestos con la base o ácido adecuados en agua o en un solvente orgánico, o en una mezcla de los dos; generalmente, se prefieren los medios no acuosos, tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Las listas de sales adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418 , Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, y Use, P.H. Stahl y C.G. Wermuth (ed.), Wiley-VCH, 2008, y Berge et al., Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19 (1977).

25 Como se utiliza en este documento, un "fosfolípido" es un lípido que incluye un resto de fosfato y una o más cadenas de carbono, tales como cadenas de ácidos grasos insaturados. Un fosfolípido puede incluir uno o más enlaces múltiples (*por ejemplo*, dobles o triples) (*por ejemplo*, una o más insaturaciones). Determinados fosfolípidos pueden facilitar la fusión con una membrana. Por ejemplo, un fosfolípido catiónico puede interaccionar con uno o más fosfolípidos cargados negativamente de una membrana (*por ejemplo*, una membrana celular o intracelular). La fusión de un fosfolípido a una membrana puede permitir que uno o más 30 elementos de una composición que contiene lípidos atraviesen la membrana permitiendo, *por ejemplo*, la administración de uno o más elementos a una célula.

35 Como se utiliza en este documento, el "índice de polidispersidad" es una relación que describe la homogeneidad de la distribución del tamaño de partícula de un sistema. Un valor pequeño, *por ejemplo*, inferior a 0.3, indica una distribución estrecha del tamaño de las partículas.

40 Como se utiliza en el presente documento, el término "polipéptido" o "polipéptido de interés" se refiere a un polímero de residuos de aminoácidos típicamente unidos por enlaces peptídicos que puede producirse de forma natural (*por ejemplo*, aislado o purificado) o sintética.

Como se utiliza en el presente documento, un "ARN" se refiere a un ácido ribonucleico que puede ser de origen natural o no natural. Por ejemplo, un ARN puede incluir componentes modificados y/o no naturales como una o más nucleobases, nucleósidos, nucleótidos o enlazadores. Un ARN puede incluir una estructura de casquete, 45 un nucleósido de terminación de cadena, un bucle de tallo, una secuencia de poliA y/o una señal de poliadenilación. Un ARN puede tener una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de interés. Por ejemplo, un ARN puede ser un ARN mensajero (ARNm). La traducción de un ARNm que codifica un polipéptido particular, por ejemplo, la traducción *in vivo* de un ARNm dentro de una célula de mamífero, puede producir el polipéptido codificado. Los ARN pueden seleccionarse del grupo no encalante que consiste en ARN interferente 50 pequeño (ARNip), ARN interferente asimétrico (ARNia), microARN (ARNmi), ARN de sustrato Dicer (ARNds), ARN de horquilla pequeña (ARNhc), ARNm, ARN guía única (ARNgu), ARNm cas9 y mezclas de los mismos.

Tal y como se utiliza en el presente documento, una "dosis unitaria" es una dosis de cualquier fármaco administrada en una dosis/en un momento/por una única vía/en un único punto de contacto, es decir, en un 55 único acto de administración.

Tal como se utiliza en el presente documento, una "dosis dividida" es la división de la dosis unitaria única o de la dosis diaria total en dos o más dosis.

60 Tal como se utiliza en el presente documento, una "dosis diaria total" es una cantidad administrada o prescrita en un periodo de 24 horas. Puede administrarse como una dosis unitaria única.

Como se usa en el presente documento, "tamaño" o "tamaño medio" en el contexto de las composiciones de nanopartículas se refiere al diámetro medio de una composición de nanopartículas.

65 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" o "paciente" se refiere a cualquier organismo

al que puede administrarse una composición según la divulgación, *por ejemplo*, con fines experimentales, diagnósticos, profilácticos y/o terapéuticos. Los sujetos típicos incluyen animales (por ejemplo, mamíferos tales como ratones, ratas, conejos, primates no humanos y seres humanos) y/o plantas.

- 5 Tal y como se usa en el presente documento, "células diana" se refiere a una cualquiera o más células de interés. Las células pueden encontrarse *in vitro*, *in vivo*, *in situ*, o en el tejido u órgano de un organismo. El organismo puede ser un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano y lo más preferiblemente un paciente.
- 10 Tal como se utiliza en el presente documento, "tejido diana" se refiere a uno o más tipos de tejidos de interés en los que la administración de un fármaco terapéutico y/o profiláctico produciría un efecto biológico y/o farmacológico deseado. Los ejemplos de tejidos diana de interés incluyen tejidos, órganos y sistemas específicos o grupos de los mismos. En aplicaciones particulares, un tejido diana puede ser un riñón, un pulmón, un bazo, endotelio vascular en vasos (*por ejemplo*, intracoronario o intrafemoral), o tejido tumoral (*por ejemplo*, mediante inyección intratumoral). Un "tejido fuera de diana" se refiere a uno cualquiera o más tipos de tejido en los que la expresión de la proteína codificada no da como resultado un efecto biológico y/o farmacológico deseado. En aplicaciones particulares, los tejidos fuera de diana pueden incluir el hígado y el bazo.
- 15 Tal como se utiliza en el presente documento, "agente terapéutico" o "agente profiláctico" se refiere a cualquier agente que, cuando se administra a un sujeto, tiene un efecto terapéutico, diagnóstico y/o profiláctico y/o provoca un efecto biológico y/o farmacológico deseado. Los agentes terapéuticos también se denominan "activos" o "agentes activos". Dichos agentes incluyen, pero no se limitan a, citotoxinas, iones radiactivos, agentes quimioterapéuticos, fármacos de moléculas pequeñas, proteínas y ácidos nucleicos.
- 20 Como se utiliza en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un agente a administrar (*por ejemplo*, ácido nucleico, fármaco, composición, agente terapéutico, agente de diagnóstico, agente profiláctico, etc.) que es suficiente, cuando se administra a un sujeto que padece o es susceptible a una infección, enfermedad, trastorno y/o afección, para tratar, mejorar los síntomas de, diagnosticar, prevenir y/o retrasar la aparición de la infección, enfermedad, trastorno y/o afección.
- 25 Como se utiliza en el presente documento, "transfección" se refiere a la introducción de una especie (*por ejemplo*, un ARN) en una célula. La transfección puede ocurrir, por ejemplo, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.
- 30 Como se utiliza en el presente documento, el término "tratar" se refiere a aliviar parcial o totalmente, mejorar, aliviar, retrasar la aparición, inhibir la progresión, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de una infección, enfermedad, trastorno y/o afección en particular. Por ejemplo, "tratar" el cáncer puede referirse a inhibir la supervivencia, el crecimiento y/o la diseminación de un tumor. El tratamiento puede administrarse a un sujeto que no muestra signos de una enfermedad, trastorno y/o afección, y/o a un sujeto que muestra únicamente síntomas iniciales de la enfermedad, trastorno y/o afección, con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar patologías asociadas con la enfermedad, trastorno y/o afección.

Como se utiliza en este documento, el "potencial zeta" es el potencial electrocinético de un lípido, *por ejemplo*, en una composición de partículas.

45 Composiciones de nanopartículas

La divulgación también presenta composiciones de nanopartículas que comprenden un componente lipídico que comprende uno o más esteroles y un compuesto según la Fórmula (I), (IA), (IB), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe), (IIf) o (IIg) como se describe en el presente documento. Las composiciones de nanopartículas de la invención son las composiciones de nanopartículas tal como se establecen en las reivindicaciones adjuntas.

En algunas realizaciones, la dimensión mayor de una composición de nanopartículas es de 1 µm o menos (*por ejemplo*, 1 µm, 900 nm, 800 nm, 700 nm, 600 nm, 500 nm, 400 nm, 300 nm, 200 nm, 175 nm, 150 nm, 125 nm, 100 nm, 75 nm, 50 nm, o menos), por ejemplo, cuando se mide mediante dispersión dinámica de luz (DLS), microscopía electrónica de transmisión, microscopía electrónica de barrido u otro método. Las composiciones de nanopartículas incluyen, por ejemplo, nanopartículas lipídicas (LNP), liposomas, vesículas lipídicas y lipoplejos. En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas son vesículas que incluyen una o más bicapas lipídicas. En ciertas realizaciones, una composición de nanopartículas incluye dos o más bicapas concéntricas separadas por compartimentos acuosos. Las bicapas lipídicas pueden funcionalizarse y/o reticularse entre sí. Las bicapas lipídicas pueden incluir uno o más ligandos, proteínas o canales.

Las composiciones de nanopartículas comprenden un componente lipídico que incluye al menos un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I), (IA), (IB), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe), (IIf) o (IIg). Por ejemplo, el componente lipídico de una composición de nanopartículas puede incluir uno o más de los Compuestos 1-280. Las composiciones de nanopartículas también pueden incluir una variedad de otros componentes. Por ejemplo, el

componente lipídico de una composición de nanopartículas puede incluir uno o más lípidos además de un lípido de acuerdo con la Fórmula (I), (IA), (IB), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe), (IIf) o (IIg).

Lípidos catiónicos/ionizables

Una composición de nanopartículas puede incluir uno o más lípidos catiónicos y/o ionizables (*por ejemplo*, lípidos que pueden tener una carga positiva o parcialmente positiva a pH fisiológico) además de un lípido de acuerdo con la Fórmula (I), (IA), (IB), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe), (IIf) o (IIg). Las composiciones de nanopartículas de la invención incluyen un lípido ionizable. Los lípidos catiónicos y/o ionizables pueden seleccionarse del grupo no limitante que consiste en 3-(didodecilamino)-N1,N1,4-tridodecil-1-piperazineetanamina (KL10), N1-[2-(didodecilamino)ethyl]-N1,N4,N4-tridodecil-1,4-piperazinedietanamina (KL22), 14,25-ditridodecil-15,18,21,24-tetraaza-octatriacontano (KL25), 1,2-dilinoleiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLin-DMA), 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA), 4-(dimetilamino)butanoato de heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ilo (DLin-MC3-DMA), 2,2-dilinoleil-4-(2-dimetilaminoethyl)-[1,3]-dioxolano (DLin-KC2-DMA), 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DODMA), 2-{8-[{(3β)-colest-5-en-3-iloxi}octil]oxi}-N,N-dimetil-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]propan-1-amina (Octil-CLinDMA), (2R)-2-{8-[{(3β)-colest-5-en-3-iloxi}octil]oxi}-N,N-dimetil-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]propan-1-amina (Octil-CLinDMA (2R)) y (2S)-2-{8-[{(3β)-colest-5-en-3-iloxi}octil]oxi}-N,N-dimetil-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]propan-1-amina (Octil-CLinDMA (2S)). Además de éstos, un lípido catiónico también puede ser un lípido que incluya un grupo amina cíclico.

Los lípidos catiónicos y/o ionizables también pueden seleccionarse del grupo no limitante que consiste en 1-linoleil-2-linoleiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-2-DMAP), 1,2-dilinoleilcarbamoloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-C-DAP), 1,2-dilinoleoil-1-3-dimetilaminopropano (DLin-DAP), 1,2-dilinoleiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLin-DMA), 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA), 2,2-dilinoleil-4-(2-dimetilaminoethyl)-[1,3]-dioxolano (DLin-KC2-DMA), (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il 4-(dimetilamino)butanoato (DLin-MC3-DMA), 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio propano (DODAP), N,N-dimetil-(2,3-dioleiloxi)propilamina (DODMA), dioctadecylamidoglicil carboxiespermina (DOGS), colesterolilcarbamato de espermina (GL-67), bis-guanidinio-espermida-colesterol (BGTC), 3β-(N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil)colesterol (DC-Chol), 1,1'-(2-(4-(2-(2-(bis(2-hidroxidodeci)amino)ethyl)(2-hidroxidodeci)amino)ethyl)piperazin-1-il)etilazanodiil)ditodecan-2-ol (C12-200), N-t-butil-N'-tetradecilamino-propionamidina (*dic14-amidina*), bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB), bromuro de N-(1,2-dimiristiloxyprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxietilamonio (DMRIE), cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC), bromuro de dioleloxiopropil-3-dimetilhidroxietilamonio (DORIE), Trifluoroacetato de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N-2-(esperminacarboxamido)ethyl)-N,N-dimetilamonio (DOSPA), cloruro de propano de 1,2-dioleiltrimetilamonio (DOTAP), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), bromuro de aminopropil-dimetil-bis(dodeciloxy)-propanaminio (GAP-DLRIE), 1,2-dioleil-sn-3-fosfoetanolamina ("DOPE") y una combinación de los mismos.

Lípidos PEG

El componente lipídico de una composición de nanopartículas puede incluir uno o más PEG o lípidos modificados con PEG. Dichas especies pueden denominarse alternativamente como lípidos PEGilados. Un PEG-lípido es un lípido modificado con polietilenenglicol. Un lípido PEG puede seleccionarse del grupo no limitante formado por fosfatidiletanaminas modificadas con PEG, ácidos fosfatídicos modificados con PEG, ceramidas modificadas con PEG (PEG-CER), dialquilaminas modificadas con PEG, diacilgliceroles modificados con PEG (PEG-DAG), dialquilgliceroles modificados con PEG y mezclas de los mismos. Por ejemplo, un lípido PEG puede ser PEG-c-DOMG, PEG-DMG, PEG-DLPE, PEG-DMPE, PEG-DPPC o un lípido PEG-DSPE.

Esteroles

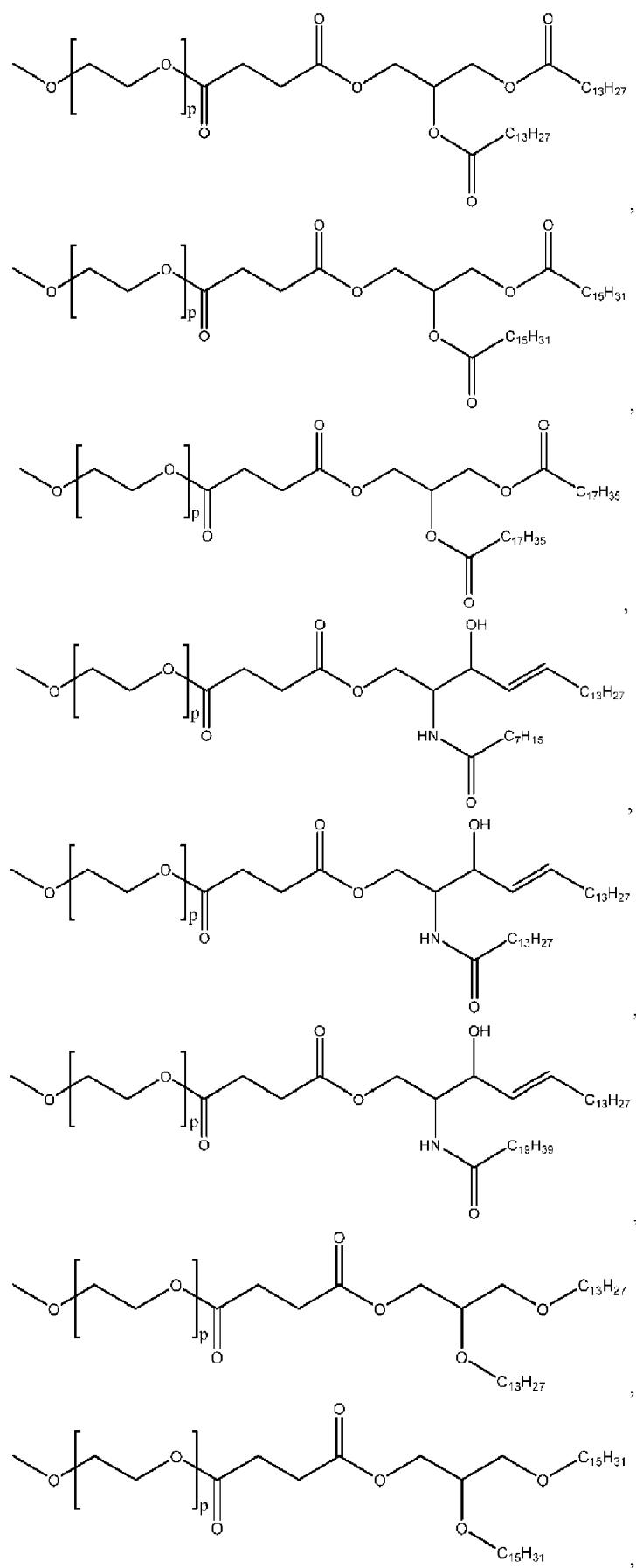
El componente lipídico de una composición de nanopartículas puede incluir uno o más esteroles, por ejemplo, los descritos en el presente documento. En algunos ejemplos, la composición incluye colesterol y un fitosterol.

En algunos ejemplos, la composición incluye colesterol y un tocoferol. En algunos ejemplos, la composición incluye fitosterol y un tocoferol. En algunas realizaciones, la composición incluye además un corticosteroide (tal como prednisolona, dexametasona, prednisona e hidrocortisona).

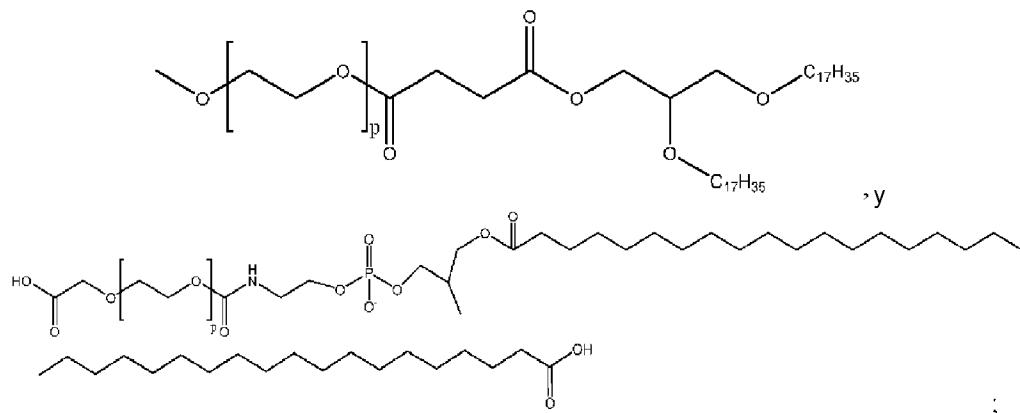
En algunas realizaciones, el tensioactivo es un resto de PEG que tiene un tamaño de aproximadamente 1000 daltons a aproximadamente 20.000 daltons.

En algunas realizaciones, el tensioactivo es un PEG-diacilglicerol (PEG-DAG), PEG-ceramida (PEG-CER) o PEG-dialquilglicerol.

En algunas realizaciones, el lípido PEG se selecciona de



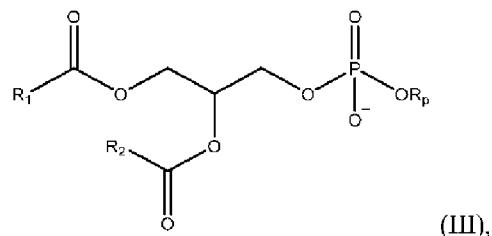
5



5 en donde p es de 1 a 40.

Fosfolípidos

10 El componente lipídico de una composición de nanopartículas de la invención incluye uno o más fosfolípidos, tales como uno o más lípidos (poli)insaturados. Los fosfolípidos pueden ensamblarse en una o más bicapas lipídicas. En general, los fosfolípidos pueden incluir una fracción de fosfolípido y una o más restos de ácido graso. Por ejemplo, un fosfolípido puede ser un lípido según la fórmula (III):



15 en la que R_p representa un resto de fosfolípido y R_1 y R_2 representan restos de ácido graso con o sin insaturación que pueden ser iguales o diferentes. Una fracción fosfolipídica puede seleccionarse del grupo no limitante que consiste en fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina, fosfatidil glicerol, fosfatidil serina, ácido fosfatídico, 2-lisofosfatidil colina y una estingomielina. Un resto de ácido graso puede seleccionarse del grupo no limitante que consiste en ácido láurico, ácido mirístico, ácido miristoleico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido alfa-linolénico, ácido erúctico, ácido fitánico, ácido araquídico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido behénico, ácido docosapentaenoico y ácido docosahexaenoico. También se contemplan especies no naturales incluyendo especies naturales con modificaciones y sustituciones incluyendo ramificación, oxidación, ciclización y alquinos. Por ejemplo, un fosfolípido puede funcionalizarse o reticularse con uno o más alquinos (*por ejemplo*, un grupo alquenilo en el que uno o más enlaces dobles se reemplazan por un enlace triple). En condiciones de reacción apropiadas, un grupo alquino puede sufrir una cicloadición catalizada por cobre al exponerse a una azida. Dichas reacciones pueden ser útiles para funcionalizar una bicapa lipídica de una composición de nanopartículas para facilitar la permeación de la membrana o el reconocimiento celular o para conjugar una composición de nanopartículas con un componente útil tal como un resto de direccionamiento o de formación de imágenes (*por ejemplo*, un tinte).

Los fosfolípidos útiles en las composiciones y métodos pueden seleccionarse del grupo no limitante que consiste en 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dilinoleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DLPC), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-fosfocolina (DMPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-diundecanoil-sn-glicero-fosfocolina (DUPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1,2-di-O-octadecenil-sn-glicero-3-fosfocolina (18:0 Diether PC), 1-oleoil-2-colesterilhemisuccinoil-sn-glicero-3-fosfocolina (OChemSPC), 1-hexadecil-sn-glicero-3-fosfocolina (C16 Lyso PC), 1,2-dilinolenoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-diaraquidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-didocosahexaenoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (ME 16.0 PE), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dilinoleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dilinolenoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-diaraquidonoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-didocosahexaenoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol) sal sódica (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina (POPE), diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE), 1-estearoil-2-oleoilfosfatidiletanolamina (SOPE), 1-estearoil-2-oleoilfosfatidicolina (SOPC),

esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilsérina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, palmitoiloleoil fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina (LPE). En algunas realizaciones, una composición de nanopartículas incluye DSPC. En ciertas realizaciones, una composición de nanopartículas incluye DOPE. En algunas realizaciones, una composición de nanopartículas incluye tanto DSPC como DOPE.

5

Adyuvantes

En algunas realizaciones, una composición de nanopartículas que incluye uno o más lípidos descritos en el presente documento puede incluir además uno o más adyuvantes, por ejemplo, adyuvante lipídico glucopiranósílico (GLA), oligodesoxinucleótidos CpG (por ejemplo, clase A o B), poli(I:C), hidróxido de aluminio y Pam3CSK4.

Agentes terapéuticos

15 Las composiciones de nanopartículas pueden incluir uno o más agentes terapéuticos y/o profilácticos. La divulgación presenta métodos para administrar un agente terapéutico y/o profiláctico a una célula u órgano de mamífero, producir un polipéptido de interés en una célula de mamífero y tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero que lo necesita, que comprende administrar a un mamífero y/o poner en contacto una célula de mamífero con una composición de nanopartículas que incluye un agente terapéutico y/o profiláctico. En algunas 20 realizaciones, un agente terapéutico está encapsulado dentro de la nanopartícula.

Los agentes terapéuticos y/o profilácticos incluyen sustancias biológicamente activas y se denominan alternativamente "agentes activos". Un agente terapéutico y/o profiláctico puede ser una sustancia que, una vez administrada a una célula u órgano, produce un cambio deseable en la célula, órgano u otro tejido o sistema corporal. Dichas especies pueden ser útiles en el tratamiento de una o más enfermedades, trastornos o afecciones. En algunas realizaciones, un agente terapéutico y/o profiláctico es un fármaco de molécula pequeña útil en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección particular. Los ejemplos de fármacos útiles en las composiciones de nanopartículas incluyen, pero no se limitan a, agentes antineoplásicos (por ejemplo, vincristina, doxorubicina, mitoxantrona, camptotecina, cisplatino, bleomicina, ciclofosfamida, 25 metotrexato y estreptozotocina), agentes antitumorales (por ejemplo, actinomicina D, vincristina, vinblastina, arabinósido de citosina, antraciclinas, agentes alquilantes, compuestos de platino, antimetabolitos y análogos de nucleósidos, tales como metotrexato y análogos de purina y pirimidina), agentes antiinfecciosos, anestésicos locales (*por ejemplo*, dibucaina y clorpromazina), bloqueadores beta-adrenérgicos (*por ejemplo*, propranolol, timolol y labetalol), agentes antihipertensivos (*por ejemplo*, clonidina e hidralazina), antidepresivos 30 (*por ejemplo*, ej., imipramina, amitriptilina y doxepina), anticonvulsivos (*por ejemplo*, fenitoína), antihistamínicos (*por ejemplo*, difenhidramina, clorfeniramina y prometazina), agentes antibióticos/antibacterianos (*p.ej.*, gentamicina, ciprofloxacino y cefoxitina), agentes antimicóticos (*p.ej.*, miconazol, terconazol, econazol, isoconazol, butaconazol, clotrimazol, itraconazol, nistatina, naftifina y anfotericina B), agentes antiparasitarios, 35 hormonas, antagonistas hormonales, inmunomoduladores, antagonistas de neurotransmisores, agentes antiglaucomatosos, vitaminas, narcóticos y agentes de diagnóstico por imágenes.

40 En algunas realizaciones, un agente terapéutico y/o profiláctico es una citotoxina, un ion radiactivo, un agente quimioterapéutico, una vacuna, un compuesto que provoca una respuesta inmunitaria y/u otro agente terapéutico y/o profiláctico. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenipósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracinediona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaina, lidocaina, propranolol, puromicina, maytansinoides, *por ejemplo*, maitansinol, raquelmicina (CC-1065), y análogos u homólogos de los mismos. Los iones radiactivos incluyen, pero no se limitan a, yodo (*por ejemplo*, yodo 125 o yodo 131), estroncio 89, fósforo, paladio, cesio, iridio, fosfato, cobalto, 45 itrio 90, samario 153 y praseodimio. Las vacunas incluyen compuestos y preparaciones que son capaces de proporcionar inmunidad contra una o más condiciones relacionadas con enfermedades infecciosas como influenza, sarampión, virus del papiloma humano (VPH), rabia, meningitis, tos ferina, tétano, peste, hepatitis y tuberculosis y pueden incluir ARNm que codifican抗ígenos y/o epítopenos derivados de enfermedades 50 infecciosas. Las vacunas también incluyen compuestos y preparaciones que dirigen una respuesta inmune contra las células cancerosas y pueden incluir ARNm que codifican抗ígenos, epítopenos y/o neoepítopenos derivados de células tumorales. Los compuestos que provocan respuestas inmunes pueden incluir vacunas, corticosteroides (*por ejemplo*, dexametasona) y otras especies. En algunas realizaciones, una vacuna y/o un compuesto capaz de provocar una respuesta inmunitaria se administra por vía intramuscular mediante una 55 composición que incluye un compuesto según la Fórmula (I), (IA), (IB), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe), (IIf) o (IIg) (*por ejemplo*, el Compuesto 3, 18, 20, 25, 26, 29, 30, 60, 108-112, o 122). Otros terapéuticos y/o profilácticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (*por ejemplo*, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo dacarbazine), agentes alquilantes (*por ejemplo*, mecloretamina, tiotepa clorambucil, 60 raquelmicina (CC-1065), melfalán, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP)cisplatino), antraciclinas, 65 dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP)cisplatino), antraciclinas (*por ejemplo*, daunorubicina (antes daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (*por ejemplo*, dactinomicina

(antes actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimitóticos (*por ejemplo*, vincristina, vinblastina, taxol y maitansinoides).

- 5 En otras realizaciones, un agente terapéutico y/o profiláctico es una proteína. Las proteínas terapéuticas útiles en las nanopartículas de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, gentamicina, amikacina, insulina, eritropoyetina (EPO), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor VIR, análogos de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), interferones, heparina, antígeno de superficie de la hepatitis B, vacuna contra la fiebre tifoidea y vacuna contra el cólera.

10 *Polinucleótidos y ácidos nucleicos*

- En algunas realizaciones, un agente terapéutico es un polinucleótido o ácido nucleico (*por ejemplo*, ácido ribonucleico o ácido desoxirribonucleico). El término "polinucleótido", en su sentido más amplio, incluye cualquier compuesto y/o sustancia que se incorpore o pueda incorporarse a una cadena de oligonucleótidos. Polinucleótidos ejemplares para uso de acuerdo con la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, uno o más de ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) incluyendo ARNm mensajero (ARNm), híbridos de los mismos, agentes inductores de ARNi, agentes de ARNi, siARN, ARNh, miARN, ARN antisentido, ribozimas, ADN catalítico, ARN que inducen la formación de triple hélice, aptámeros, vectores, etc.
- 20 En algunas realizaciones, un fármaco terapéutico y/o profiláctico es un ARN. Los ARN útiles en las composiciones y métodos descritos en el presente documento se pueden seleccionar del grupo que consiste en, pero no se limitan a, ARN cortos, antagonistas, antisentido, ribozimas, ARN interferente pequeño (ARNip), ARN interferente asimétrico (ARNia), microARN (ARNmi), ARN Dicer-sustrato (ARNds), ARN de horquilla pequeña (ARNhc), ARN de transferencia (ARNt), ARN mensajero (ARNm) y mezclas de los mismos. En ciertas 25 realizaciones, el ARN es un ARNm.

- En ciertas realizaciones, un agente terapéutico y/o profiláctico es un ARNm. Un ARNm puede codificar cualquier polipéptido de interés, incluyendo cualquier polipéptido de origen natural o no natural o modificado de otro modo. Un polipéptido codificado por un ARNm puede ser de cualquier tamaño y puede tener cualquier estructura o actividad secundaria. En algunas realizaciones, un polipéptido codificado por un ARNm puede tener un efecto terapéutico cuando se expresa en una célula.

- 30 En otras realizaciones, un agente terapéutico y/o profiláctico es un ARNi. Un ARNi puede ser capaz de inhibir o regular de forma negativa selectivamente la expresión de un gen de interés. Por ejemplo, se podría seleccionar un ARNi para silenciar un gen asociado con una enfermedad, trastorno o condición particular tras la administración a un sujeto que lo necesite de una composición de nanopartículas que incluya el ARNi. Un ARNi puede comprender una secuencia que sea complementaria a una secuencia de ARNm que codifica un gen o proteína de interés. En algunas realizaciones, el ARNi puede ser un ARNi inmunomodulador.

- 40 En ciertas realizaciones, un agente terapéutico y/o profiláctico es un ARNgu y/o un ARNm de cas9. El ARNgu y/o el ARNm de cas9 se pueden utilizar como herramientas de edición genética. Por ejemplo, un complejo ARNgu-cas9 puede afectar la traducción del ARNm de genes celulares.

- 45 En algunas realizaciones, un agente terapéutico y/o profiláctico es un ARNh o un vector o plásmido que lo codifica. Se puede producir un ARNh dentro de una célula objetivo mediante la administración de una construcción apropiada al núcleo. Las construcciones y mecanismos relacionados con el ARNh son bien conocidos en las técnicas pertinentes.

- 50 Los ácidos nucleicos y polinucleótidos útiles en la divulgación incluyen típicamente una primera región de nucleósidos enlazados que codifica un polipéptido de interés (*por ejemplo*, una región codificante), una primera región flanqueante situada en el extremo 5' de la primera región (*por ejemplo*, una 5'-UTR), una segunda región flanqueante situada en el extremo 3' de la primera región (*por ejemplo*, una 3'-UTR), al menos una región 5'-cap, y una región 3'-estabilizante. En algunas realizaciones, un ácido nucleico o polinucleótido incluye además una región poli-A o una secuencia Kozak (*por ejemplo*, en la 5'-UTR). En algunos casos, los polinucleótidos 55 pueden contener una o más secuencias de nucleótidos intrónicas capaces de ser extraídas del polinucleótido. En algunas realizaciones, un polinucleótido o ácido nucleico (*por ejemplo*, un ARNm) puede incluir una estructura de 5'-cap, un nucleótido de terminación de cadena, un bucle de tallo, una secuencia de poliA y/o una señal de poliadenilación. Cualquiera de las regiones de un ácido nucleico puede incluir uno o más componentes alternativos (*por ejemplo*, un nucleósido alternativo). Por ejemplo, la región estabilizadora 3' 60 puede contener un nucleósido alternativo tal como un L-nucleósido, una timidina invertida o un nucleósido 2'-O-metilo y/o la región codificante, 5'-UTR, 3' -UTR o región de casquete puede incluir un nucleósido alternativo tal como una uridina 5-sustituida (*por ejemplo*, 5-metoxiuridina), una pseudouridina 1-sustituida (*por ejemplo*, 1-metil-pseudouridina o 1-etil-pseudouridina) y/o una citidina 5-sustituida (*por ejemplo*, 5-metil-citidina).

- 65 Generalmente, la longitud más corta de un polinucleótido puede ser la longitud de la secuencia polinucleotídica suficiente para codificar un dipéptido. En otra realización, la longitud de la secuencia polinucleotídica es

- suficiente para codificar un tripéptido. En otra realización, la longitud de la secuencia polinucleotídica es suficiente para codificar un tetrapéptido. En otra realización, la longitud de la secuencia polinucleotídica es suficiente para codificar un pentapéptido. En otra realización, la longitud de la secuencia polinucleotídica es suficiente para codificar un hexapéptido. En otra realización, la longitud de la secuencia polinucleotídica es suficiente para codificar un heptapéptido. En otra realización, la longitud de la secuencia polinucleotídica es suficiente para codificar un octapéptido. En otra realización, la longitud de la secuencia polinucleotídica es suficiente para codificar un noapéptido. En otra realización, la longitud de la secuencia polinucleotídica es suficiente para codificar un decapéptido.
- 10 Ejemplos de dipéptidos que las secuencias polinucleotídicas alternativas pueden codificar incluyen, pero no se limitan a, carnosina y anserina.

En algunos casos, un polinucleótido tiene más de 30 nucleótidos de longitud. En otra realización, la molécula polinucleotídica tiene más de 35 nucleótidos de longitud. En otra realización, la longitud es de al menos 40 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 45 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 55 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 50 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 60 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 80 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 90 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 100 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 120 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 140 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 160 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 180 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 200 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 250 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 300 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 350 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 400 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 450 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 500 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 600 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 700 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 800 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 900 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1000 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1100 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1200 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1300 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1400 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1500 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1600 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1800 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 2000 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 2500 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 3000 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 4000 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 5000 nucleótidos o mayor que 5000 nucleótidos.

Los ácidos nucleicos y polinucleótidos pueden incluir uno o más componentes naturales, incluidos cualquiera de los nucleótidos canónicos A (adenosina), G (guanosina), C (citosina), U (uridina) o T (timidina). En una realización, todos o sustancialmente todos los nucleótidos que comprenden (a) el 5'-UTR, (b) el marco de lectura abierto (ORF), (c) el 3'-UTR, (d) la cola de poli A y cualquier combinación de (a, b, c o d anteriores) comprenden los nucleótidos canónicos naturales A (adenosina), G (guanosina), C (citosina), U (uridina) o T (timidina).

45 Los ácidos nucleicos y polinucleótidos pueden incluir uno o más componentes alternativos, como se describe en el presente documento, que imparten propiedades útiles que incluyen mayor estabilidad y/o la falta de una inducción sustancial de la respuesta inmune innata de una célula en la que se introduce el polinucleótido. Por ejemplo, un polinucleótido o ácido nucleico alternativo exhibe una degradación reducida en una célula en la que se introduce el polinucleótido o ácido nucleico, en relación con un polinucleótido o ácido nucleico inalterado correspondiente. Estas especies alternativas pueden mejorar la eficacia de la producción de proteínas, la retención intracelular de los polinucleótidos y/o la viabilidad de las células contactadas, así como poseer una inmunogenicidad reducida.

55 Los polinucleótidos y ácidos nucleicos pueden ser de origen natural o no natural. Los polinucleótidos y ácidos nucleicos pueden incluir una o más nucleobases, nucleósidos, nucleótidos o combinaciones de los mismos modificados (*por ejemplo*, alterados o alternativos). Los ácidos nucleicos y polinucleótidos útiles en una composición de nanopartículas pueden incluir cualquier modificación o alteración útil, como a la nucleobase, al azúcar o al enlace internucleósido (*por ejemplo*, a un fosfato de enlace / a un enlace fosfodiéster / a la estructura principal fosfodiéster). En ciertas realizaciones, las alteraciones (*por ejemplo*, una o más alteraciones) están presentes en cada una de la nucleobase, el azúcar y el enlace internucleósido. Las alteraciones según la presente divulgación pueden ser alteraciones de ácidos ribonucleicos (ARN) a ácidos desoxirribonucleicos (ADN), por ejemplo, la sustitución del 2'-OH del anillo ribofuranosilo por 2'-H, ácidos nucleicos de treosa (ANT), ácidos nucleicos glicólicos (ANG), ácidos nucleicos peptídicos (ANP), ácidos nucleicos bloqueados (ANL), o híbridos de los mismos. Se describen modificaciones adicionales en el presente documento.

65 Los polinucleótidos y ácidos nucleicos pueden o no estar alterados uniformemente a lo largo de toda la longitud

de la molécula. Por ejemplo, uno o varios o todos los tipos de nucleótidos (*por ejemplo*, purina o pirimidina, o uno o varios o todos de A, G, U, C) pueden o no estar uniformemente alterados en un polinucleótido o ácido nucleico, o en una determinada región de secuencia predeterminada del mismo. En algunos casos, todos los nucleótidos X en un polinucleótido (o en una región de secuencia dada del mismo) están alterados, donde X puede ser cualquiera de los nucleótidos A, G, U, C, o cualquiera de las combinaciones A+G, A+U, A+C, G+U, G+C, U+C, A+G+U, A+G+C, G+U+C o A+G+C.

En un polinucleótido pueden existir diferentes alteraciones de azúcar y/o enlaces internucleósidos (*por ejemplo*, estructuras principales) en varias posiciones. Un experto en la materia apreciará que los análogos de nucleótidos u otras alteraciones pueden localizarse en cualquier posición de un polinucleótido de forma que la función del polinucleótido no disminuya sustancialmente. Una alteración también puede ser una alteración terminal 5' o 3'. En algunas realizaciones, el polinucleótido incluye una alteración en el extremo 3'. El polinucleótido puede contener desde aproximadamente el 1 % hasta aproximadamente el 100 % de nucleótidos alternativos (ya sea en relación con el contenido total de nucleótidos, o en relación con uno o más tipos de nucleótidos, es decir, uno o más de A, G, U o C) o cualquier porcentaje intermedio (*por ejemplo*, desde el 1 % hasta el 20 %, desde el 1 % hasta el 25 %, desde el 1 % hasta el 50 %, desde el 1 % hasta el 60 %, desde el 1 % hasta el 70 %, desde el 1 % hasta el 80 %, desde el 1 % hasta el 90 %, desde el 1 % hasta el 95 %, del 10 % al 20 %, del 10 % al 25 %, del 10 % al 50 %, del 10 % al 60 %, del 10 % al 70 %, del 10 % al 80 %, del 10 % al 90 %, del 10 % al 95 %, del 10 % al 100 %, del 20 % al 25 %, del 20 % al 50 %, del 20 % al 60 %, del 20 % al 70 %, del 20 % al 80 %, del 20 % al 90 %, del 20 % al 95 %, del 20 % al 100 %, del 50 % al 60 %, del 50 % al 70 %, del 50 % al 80 %, del 50 % al 90 %, del 50 % al 100 %, del 70 % al 80 %, del 70 % al 90 %, del 70 % al 95 %, del 70 % al 100 %, del 80 % al 90 %, del 80 % al 95 %, del 80 % al 100 %, del 90 % al 95 %, del 90 % al 100 % y del 95 % al 100 %). Se entenderá que cualquier porcentaje restante se explica por la presencia de un nucleótido canónico (*por ejemplo*, A, G, U o C).

Los polinucleótidos pueden contener como mínimo cero y como máximo 100 % de nucleótidos alternativos, o cualquier porcentaje intermedio, como al menos 5 % de nucleótidos alternativos, al menos 10 % de nucleótidos alternativos, al menos 25 % de nucleótidos alternativos, al menos 50 % de nucleótidos alternativos, al menos 80 % de nucleótidos alternativos, o al menos 90 % de nucleótidos alternativos. Por ejemplo, los polinucleótidos pueden contener una pirimidina alternativa, como un uracilo o una citosina alternativos. En algunas realizaciones, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 25 %, al menos el 50 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o el 100 % del uracilo de un polinucleótido se sustituye por un uracilo alternativo (*por ejemplo*, un uracilo 5-sustituido). El uracilo alternativo puede sustituirse por un compuesto que tenga una estructura única, o puede sustituirse por una pluralidad de compuestos que tengan estructuras diferentes (*por ejemplo*, 2, 3, 4 o más estructuras únicas). En algunos casos, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 25 %, al menos el 50 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o el 100 % de la citosina del polinucleótido se sustituye por una citosina alternativa (*por ejemplo*, una citosina 5-sustituida). La citosina alternativa puede sustituirse por un compuesto que tenga una estructura única, o puede sustituirse por una pluralidad de compuestos que tengan estructuras diferentes (*por ejemplo*, 2, 3, 4 o más estructuras únicas).

En algunos casos, los ácidos nucleicos no inducen sustancialmente una respuesta inmune innata de una célula en la que se introduce el polinucleótido (*por ejemplo*, ARNm). Las características de una respuesta inmunitaria innata inducida incluyen 1) aumento de la expresión de citoquinas proinflamatorias, 2) activación de PRR intracelulares (RIG-I, MDA5, etc., y/o 3) terminación o reducción de la traducción de proteínas.

Los ácidos nucleicos pueden incluir opcionalmente otros agentes (*por ejemplo*, agentes inductores de ARNi, agentes de ARNi, siARN, ARNhC, miARN, ARN antisentido, ribozimas, ADN catalítico, ARNt, ARN que inducen la formación de triple hélice, aptámeros y vectores). En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos pueden incluir uno o más ARN mensajeros (ARNm) que tengan uno o más nucleósidos o nucleótidos alternativos (es decir, moléculas de ARNm alternativas).

En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico (*por ejemplo*, ARNm), fórmula, composición o método asociado a la misma comprende uno o más polinucleótidos que comprenden características como las descritas en los documentos WO2002/098443, WO2003/051401, WO2008/052770, WO2009127230, WO2006122828, WO2008/083949, WO2010088927, WO2010/037539, WO2004/004743, WO2005/016376, WO2006/024518, WO2007/095976, WO2008/014979, WO2008/077592, WO2009/030481, WO2009/095226, WO2011069586, WO2011026641, WO2011/144358, WO2012019780, WO2012013326, WO2012089338, WO2012113513, WO2012116811, WO2012116810, WO2013113502, WO2013113501, WO2013113736, WO2013143698, WO2013143699, WO2013143700, WO2013/120626, WO2013120627, WO2013120628, WO2013120629, WO2013174409, WO2014127917, WO2015/024669, WO2015/024668, WO2015/024667, WO2015/024665, WO2015/024666, WO2015/024664, WO2015101415, WO2015101414, WO2015024667, WO2015062738, WO2015101416.

Alternativas de nucleobases

Los nucleósidos y nucleótidos alternativos pueden incluir una nucleobase alternativa. Una nucleobase de un

ácido nucleico es una base orgánica tal como una purina o pirimidina o un derivado de la misma. Una nucleobase puede ser una base canónica (por ejemplo, adenina, guanina, uracilo, timina y citosina). Estas nucleobases se pueden alterar o reemplazar totalmente para proporcionar moléculas de polinucleótidos que tengan propiedades mejoradas, *por ejemplo*, mayor estabilidad, tal como resistencia a las nucleasas. Las bases no canónicas o modificadas pueden incluir, por ejemplo, una o más sustituciones o modificaciones que incluyen, entre otras, sustituciones de alquilo, arilo, halo, oxo, hidroxilo, alquiloxi y/o tio; uno o más anillos fusionados o abiertos; oxidación; y/o reducción.

El emparejamiento de bases de nucleótidos alternativos abarca no sólo los pares de bases estándar adenina-timina, adenina-uracilo o guanina-citosina, sino también los pares de bases formados entre nucleótidos y/o nucleótidos alternativos que incluyen bases no estándar o alternativas, en los que la disposición de los donantes de enlaces de hidrógeno y los aceptores de enlaces de hidrógeno permite el enlace de hidrógeno entre una base no estándar y una base estándar o entre dos estructuras de bases no estándar complementarias. Un ejemplo de dicho emparejamiento de bases no estándar es el emparejamiento de bases entre el nucleótido alternativo inosina y adenina, citosina o uracilo.

En algunas realizaciones, la nucleobase es un uracilo alternativo. Las nucleobases y nucleósidos ejemplares que tienen un uracilo alternativo incluyen pseudouridina (ψ), ribonucleósido de piridin-4-ona, 5-aza-uracilo, 6-aza-uracilo, 2-tio-5-aza-uracilo, 2-tio-uracilo (s^2U), 4-tio-uracilo (s^4U), 4-tio-pseudouridina, 2-tio-pseudouridina, 5-hidroxi-uracil o (ho^5U), 5-aminoallil-uracilo, 5-halo-uracilo (*por ejemplo*, 5-iodo-uracilo o 5-bromo-uracilo), 3-metil-uracilo (m^3U), 5-metoxi-uracilo (mo^5U), ácido uracilo 5-oxiacético (cmo^5U), éster metílico del ácido uracilo 5-oxoacético (mcm^5U), 5-carboximetil-uracilo (cm^5U), 1-carboximetil-pseudouridina, 5-carboxihidroximetil-uracilo (chm^5U), 5-carboxihidroximetil-uracil metil éster ($mchm^5U$), 5-metoxicarbonilmethyl-uracilo (mcm^5U), 5-metoxicarbonilmethyl-2-tio-uracilo (mcm^5s^2U), 5-aminometil-2-tio-uracilo (nm^5s^2U), 5-metilaminometil-uracilo (mm^5U), 5-metilaminometil-2-tio-uracilo (mm^5s^2U), 5-metilaminometil-2-seleno-uracil o (mm^5se^2U), 5-carbamoilmetil-uracilo (ncm^5U), 5-carboximetilaminometil-uracilo ($cmnm^5U$), 5-carboximetilaminometil-2-tio-uracilo ($cmnm^5s^2U$), 5-propynil-uracilo, 1-propynil-pseudouracilo, 5-taurinometil-uracilo (tm^5U), 1-taurinometil-pseudouridina, 5-taurinometil-2-tio-uracilo (tm^5s^2U), 1-taurinometil-4-tio-pseudouridina, 5-metil-uracilo (m^5U , es decir, que tiene la nucleobase desoxitimina), 1-metil-pseudouridina ($m^1\psi$), 1-ethyl-pseudouridina ($E^1\psi$), 5-metil-2-tio-uracilo (m^5s^2U), 1-metil-4-tio-pseudouridina ($m^1s^4\psi$), 4-tio-1-metil-pseudouridina, 3-metil-pseudouridina ($m^3\psi$), 2-tio-1-metil-pseudouridina, 1-metil-1-deaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-1-deaza-pseudouridina, dihidrouracilo (D), dihydropseudouridina, 5,6-dihydrouracilo, 5-metil-dihydrouracilo (m^5D), 2-tio-dihydrouracilo, 2-tio-dihydropseudouridina, 2-metoxi-uracilo, 2-metoxi-4-tio-uracilo, 4-metoxi-pseudouridina, 4-metoxi-2-tio-pseudouridina, N1-metil-pseudouridina, 3-(3-amino-3-carboxipropil)uracilo (acp^3U), 1-metil-3-(3-amino-3-carboxipropil)pseudouridina ($acp^3\psi$), 5-(isopentenilaminometil)uracil o (inm^5U), 5-(isopentenilaminometil)-2-tio-uracilo (inm^5s^2U), 5,2'-O-dimetil-uridina (m^5Um), 2-tio-2'-O-metil-uridina (s^2Um), 5-metoxicarbonilmethyl-2'-O-metil-uridina (mcm^5Um), 5-carbamoilmetil-2'-O-metil-uridina (ncm^5Um), 5-carboximetilaminometil-2'-O-metil-uridina ($cmnm^5Um$), 3,2'-O-dimetil-uridina (m^3Um), y 5-(isopentenilaminometil)-2'-O-metil-uridina (inm^5Um), 1-tio-uracilo, deoxitimidina, 5-(2-carbometoxivinil)-uracilo, 5-(carbamoilhidroximetil)-uracilo, 5-carbamoilmetil-2-tio-uracilo, 5-carboximetil-2-tio-uracilo, 5-cyanometil-uracilo, 5-metoxi-2-tio-uracilo, y 5-[3-(1-E-propenilamino)]uracilo.

En algunas realizaciones, la nucleobase es una citosina alternativa. Las nucleobases y nucleósidos ejemplares que tienen una citosina alternativa incluyen 5-aza-citosina, 6-aza-citosina, pseudoisocitidina, 3-metil-citosina (m^3C), N4-acetil-citosina ($ac4C$), 5-formil-citosina ($f5C$), N4-metil-citosina ($m4C$), 5-metil-citosina ($m5C$), 5-halo-citosina (*por ejemplo*, 5-yodo-citosina), 5-hidroximetil-citosina (hm^5C), 1-metil-pseudoisocitidina, pirrolo-citosina, pirrolo-pseudoisocitidina, 2-tio-citosina (s^2C), 2-tio-5-metil-citosina, 4-tio-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, 1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, zebularina, 5-aza-zebularina, 5-metil-zebularina, 5-aza-2-tio-zebularina, 2-tio-zebularina, 2-metoxi-citosina, 2-metoxi-5-metil-citosina, 4-metoxi-pseudoisocitidina, 4-metoxi-1-metil-pseudoisocitidina, lisidina ($k2C$), 5,2'-O-dimetil-citidina ($m5Cm$), N4-acetyl-2'-O-metil-citidina ($ac4Cm$), N4,2'-O-dimetil-citidina ($m4Cm$), 5-formil-2'-O-metil-citidina ($f5Cm$), N4,N4,2'-O-trimetil-citidina ($m42Cm$), 1-ti-citosina, 5-hidroxi-citosina, 5-(3-azidopropil)-citosina y 5-(2-azidoetil)-citosina.

En algunas realizaciones, la nucleobase es una adenina alternativa. Las nucleobases y nucleósidos ejemplares que tienen una adenina alternativa incluyen 2-amino-purina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-halo-purina (*por ejemplo*, 2-amino-6-cloro-purina), 6-halo-purina (*por ejemplo*, 6-cloro-purina), 2-amino-6-metil-purina, 8-azido-adenina, 7-deaza-adenina, 7-deaza-8-aza-adenina, 7-deaza-2-amino-purina, 7-deaza-8-aza-2-amino-purina, 7-deaza-2,6-diaminopurina, 7-deaza-8-aza-2,6-diaminopurina, 1-metil-adenina ($m1A$), 2-metil-adenina ($m2A$), N6-metil-adenina ($m6A$), 2-metiltio-N6-metil-adenina ($ms2m6A$), N6-isopentenil-adenina ($i6A$), 2-metiltio-N6-isopentenil-adenina ($ms2i6A$), N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenina ($io6A$), 2-metiltio-N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenina ($ms2io6A$), N6-glicinilcarbamoi-adenina ($g6A$), N6-treonilcarbamoi-adenina ($t6A$), N6-metil-N6-treonilcarbamoi-adenina ($m6t6A$), 2-metiltio-N6-treonilcarbamoi-adenina ($ms2g6A$), N6,N6-dimetil-adenina ($m62A$), N6-hidroxinorvalilcarbamoi-adenina ($hn6A$), 2-metiltio-N6-hidroxinorvalilcarbamoi-adenina ($ms2hn6A$), N6-acetil-adenina ($ac6A$), 7-metil-adenina, 2-metiltio-adenina, 2-metoxi-adenina, N6,2'-O-dimetil-adenosina ($m6Am$), N6,N6,2'-O-trimetil-adenosina ($m62Am$), 1,2'-O-dimetil-adenosina ($m1Am$), 2-

amino-N6-metil-purina, 1-tio-adenina, 8-azido-adenina, N6-(19-amino-pentaoxanonadecil)-adenina, 2,8-dimetil-adenina, N6-formil-adenina y N6-hidroximetil-adenina.

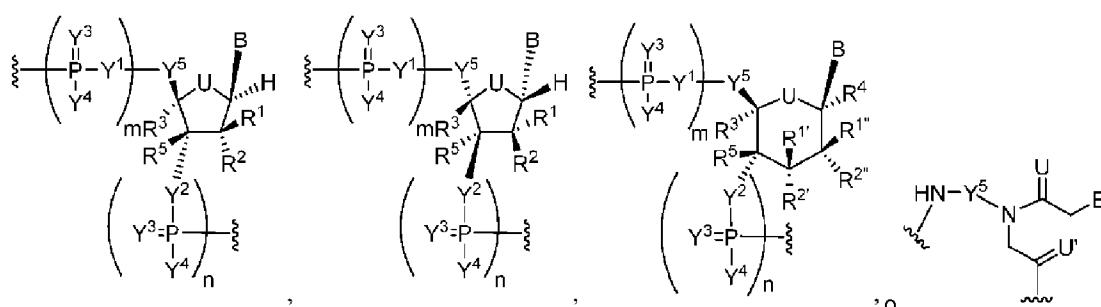
En algunas realizaciones, la nucleobase es una guanina alternativa. Las nucleobases y nucleósidos ejemplares que tienen una guanina alternativa incluyen inosina (I), 1-metil-inosina (m1I), wyoisina (imG), metilwyoisina (mimG), 4-desmetil-wyoisina (imG-14), isowyosina (imG2), wybutosina (yW), peroxywybutosina (o2yW), hidroxiwybutosina (OHyW), hidroxiwybutosina submodificada (OHyW*), 7-deaza-guanina, queuosina (Q), epoxiqueuosina (oQ), galactosil-queuosina (galQ), manosil-queuosina (manQ), 7-ciano-7-deaza-guanina (preQ0), 7-aminometil-7-deaza-guanina (preQ1), arqueosina (G+), 7-deaza-8-aza-guanina, 6-tio-guanina, 6-tio-7-deaza-guanina, 6-tio-7-deaza-8-aza-guanina, 7-metil-guanina (m7G), 6-tio-7-metil-guanina, 7-metil-inosina, 6-metoxi-guanina, 1-metil-guanina (m1G), N2-metil-guanina (m2G), N2,N2-dimetil-guanina (m22G), N2,7-dimetil-guanina (m2,7G), N2, N2,7-dimetil-guanina (m2,2,7G), 8-oxo-guanina, 7-metil-8-oxo-guanina, 1-metil-6-tio-guanina, N2-metil-6-tio-guanina, N2,N2-dimetil-6-tio-guanina, N2-metil-2'-O-metil-guanosina (m2Gm), N2,N2-dimetil-2'-O-metil-guanosina (m22Gm), 1-metil-2'-O-metil-guanosina (m1Gm), N2,7-dimetil-2'-O-metil-guanosina (m2,7Gm), 2'-O-metil-inosina (Im), 1,2'-O-dimetil-inosina (m1Im), 1-tio-guanina y O-6-metil-guanina.

La nucleobase alternativa de un nucleótido puede ser independientemente una purina, una pirimidina, un análogo de purina o pirimidina. Por ejemplo, la nucleobase puede ser una alternativa a la adenina, citosina, guanina, uracilo o hipoxantina. En otra realización, la nucleobase también puede incluir, por ejemplo, derivados sintéticos y de origen natural de una base, incluyendo pirazolo[3,4-d]pirimidinas, 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo (*por ejemplo*, 8-bromo), 8-amino, 8-tiol, 8-tialquilo, 8-hidroxi y otros 8-sustituidos. adeninas y guaninas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, deazaguanina, 7-deazaguanina, 3-deazaguanina, deazaadenina, 7-deazaadenina, 3-deazaadenina, pirazolo[3,4-d]pirimidina, imidazo[1,5-a]1,3,5 triazinonas, 9-deazapurinas, imidazo[4,5-d]pirazinas, tiazolo[4,5-d]pirimidinas, pirazin-2-onas, 1,2,4-triazina, piridazina; o 1,3,5 triazina.

Cuando los nucleótidos se representan utilizando la abreviatura A, G, C, T o U, cada letra se refiere a la base representativa y/o derivados de la misma, *por ejemplo*, A incluye adenina o análogos de adenina, *por ejemplo*, 7-deaza adenina).

Alteraciones en el azúcar

Los nucleósidos incluyen una molécula de azúcar (*por ejemplo*, un azúcar de 5 o 6 carbonos, como pentosa, ribosa, arabinosa, xilosa, glucosa, galactosa o un derivado desoxirribonucleico de los mismos) en combinación con una nucleobase, mientras que los nucleótidos son nucleósidos que contienen un nucleósido y un grupo fosfato o grupo alternativo (*por ejemplo*, grupo boranofosfato, tiofosfato, selenofosfato, fosfonato, alquilo, amidato y glicerol). Un nucleósido o nucleótido puede ser una especie canónica, *por ejemplo*, un nucleósido o nucleótido que incluye una nucleobase canónica, un azúcar y, en el caso de nucleótidos, un grupo fosfato, o puede ser un nucleósido o nucleótido alternativo que incluye uno o más componentes alternativos. Por ejemplo, los nucleósidos y nucleótidos alternativos pueden alterarse en el azúcar del nucleósido o nucleótido. En algunas realizaciones, los nucleósidos o nucleótidos alternativos incluyen la estructura:



Fórmula IV

Fórmula V

Fórmula VI

Fórmula VII.

- En cada una de las Fórmulas IV, V, VI y VII,
cada uno de m y n es independientemente un entero de 0 a 5,
cada uno de U y U', independientemente, es O, S, N(R^U)_{nu}, o C(R^U)_{nu}, donde nu es un número entero de 0 a 2
y cada R^U es, independientemente, H, halo, o alquilo opcionalmente sustituido;

cada uno de R¹, R², R^{1"}, R^{2"}, R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ es, independientemente, si está presente, H, halo, hidroxi, tiol, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alqueniloxi opcionalmente sustituido, alquiniloxi opcionalmente sustituido, aminoalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido, hidroxialcoxi opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, azido, arilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenilo opcionalmente sustituido, aminoalquinilo opcionalmente sustituido, o ausente; en donde la combinación de R³ con uno o más de R¹, R^{1"}, R², R^{2"} o R⁵ (por ejemplo, la combinación de R¹ y R³, la combinación de R^{1"} y R³, la combinación de R² y R³, la combinación de R²" y R³ o la combinación de R⁵ y R³) pueden unirse para formar alquíleno opcionalmente sustituido o heteroalquíleno opcionalmente sustituido y, tomados junto con los carbonos a los que están unidos,

- 5 proporcionar un heterociclico opcionalmente sustituido (por ejemplo, un heterociclico bicíclico, tricíclico o tetracíclico); en donde la combinación de R⁵ con uno o más de R¹, R^{1"}, R²" o R^{2"} (por ejemplo, la combinación de R¹ y R⁵, la combinación de R² y R⁵, o la combinación de R²" y R⁵) pueden unirse para formar alquíleno opcionalmente sustituido o heteroalquíleno opcionalmente sustituido y, tomados junto con los carbonos a los que están unidos, proporcionar un heterociclico opcionalmente sustituido (por ejemplo, un heterociclico bicíclico, tricíclico o tetracíclico); y en donde la combinación de R⁴ y uno o más de R¹, R^{1"}, R²", R³ o R⁵ pueden unirse para formar alquíleno opcionalmente sustituido o heteroalquíleno opcionalmente sustituido y, tomados junto con los carbonos a los que están unidos, proporcionan un heterociclico opcionalmente sustituido (por ejemplo, un heterociclico bicíclico, tricíclico o tetracíclico); cada uno de m' y m" es, independientemente, un número entero de 0 a 3 (por ejemplo, de 0 a 2, de 0 a 1, de 1 a 3 o de 1 a 2);
- 10
- 15
- 20

- 20 cada uno de Y¹, Y² e Y³ es, independientemente, O, S, Se, -NR^{N1}-, alquíleno opcionalmente sustituido o heteroalquíleno opcionalmente sustituido, donde R^{N1} es H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido o ausente; cada Y⁴ es, independientemente, H, hidroxi, tiol, boranilo, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alqueniloxi opcionalmente sustituido, alquiniloxi opcionalmente sustituido, tioalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido o amino opcionalmente sustituido;
- 25

- 30 cada Y⁵ es, independientemente, O, S, Se, alquíleno opcionalmente sustituido (por ejemplo, metíleno) o heteroalquíleno opcionalmente sustituido; y

B es una nucleobase, modificada o no modificada. En algunas realizaciones, el grupo 2'-hidroxi (OH) puede modificarse o reemplazarse con varios sustituyentes diferentes. Las sustituciones ejemplares en la posición 2' incluyen, pero no se limitan a, H, azido, halo (*por ejemplo, flúor*), alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido (*por ejemplo, metil*); alcoxi C₁₋₆ opcionalmente sustituido (*por ejemplo, metoxi o etoxi*); arilloxi C₆₋₁₀ opcionalmente sustituido; cicloalquilo C₃₋₈ opcionalmente sustituido; alcoxi C₁₋₆-arilo C₆₋₁₀ opcionalmente sustituido, (heterociclico)oxi C₁₋₁₂ opcionalmente sustituido; un azúcar (*por ejemplo, ribosa, pentosa o cualquiera de las descritas en el presente documento*); un polietilenglicol (PEG), -O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OR, donde R es H o alquilo opcionalmente sustituido, y n es un número entero de 0 a 20 (*por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 8, de 0 a 10, de 0 a 16, de 1 a 4, de 1 a 8, de 1 a 10, de 1 a 16, de 1 a 20, de 2 a 4, de 2 a 8, de 2 a 10, de 2 a 16, de 2 a 20, de 4 a 8, de 4 a 10, de 4 a 16 y de 4 a 20*); ácidos nucleicos "bloqueados" (LNA) en los que el 2'-hidroxi está conectado por un alquíleno C₁₋₆ o puente heteroalquíleno C₁₋₆ al carbono 4' del mismo azúcar ribosa, donde los puentes ejemplares incluyen puentes de metíleno, propileno, éter o amino; aminoalquilo, como se define en este documento; aminoalcoxi, como se define en este documento; amino como se define en el presente documento; y aminoácido, como se define en el presente documento.

Generalmente, el ARN incluye el grupo de azúcar ribosa, que es un anillo de 5 miembros que tiene un oxígeno. Los nucleótidos alternativos ejemplares y no limitantes incluyen el reemplazo del oxígeno en la ribosa (*por ejemplo, con S, Se o alquíleno, como metíleno o etíleno*); la adición de un doble enlace (*por ejemplo, para reemplazar la ribosa con ciclopentenilo o ciclohexenilo*); la contracción del anillo de la ribosa (*por ejemplo, para formar un anillo de 4 miembros de ciclobutano u oxetano*); la expansión del anillo de la ribosa (*por ejemplo, para formar un anillo de 6 o 7 miembros que tiene un carbono o heteroátomo adicional, como para anidrohexitol, altritol, manitol, ciclohexanilo, ciclohexenilo y morfolino (que también tiene una cadena principal de fosforamidato)*); formas multicíclicas (*por ejemplo, formas tricíclicas y "desbloqueadas", como el ácido nucleico de glicol (GNA) (*por ejemplo, R-GNA o S-GNA, donde la ribosa se reemplaza por unidades de glicol unidas a enlaces fosfodiéster*), el ácido nucleico de treosa (TNA, donde la ribosa se reemplaza con α-L-treofuranosil-(3'→2')) y el ácido nucleico peptídico (PNA, donde los enlaces 2-amino-etil-glicina reemplazan la cadena principal de ribosa y fosfodiéster)*).

- 50
- 55
- 60

En algunas realizaciones, el grupo azúcar contiene uno o más carbonos que poseen la configuración estereoquímica opuesta del carbono correspondiente en la ribosa. Por lo tanto, una molécula de polinucleótido puede incluir nucleótidos que contienen, *por ejemplo, arabinosa o L-ribosa, como azúcar*.

En algunas realizaciones, el polinucleótido incluye al menos un nucleósido en donde el azúcar es L-ribosa, 2'-

- 65 O-metil-ribosa, 2'-fluoro-ribosa, arabinosa, hexitol, un LNA o un PNA.

Alteraciones en el enlace internucleósido

Los nucleótidos alternativos se pueden alterar en el enlace internucleósido (*por ejemplo*, la cadena principal de fosfato). En el presente documento, en el contexto de la cadena principal de polinucleótidos, las frases "fosfato" y "fosfodiéster" se usan indistintamente. Los grupos fosfato de la cadena principal se pueden modificar reemplazando uno o más de los átomos de oxígeno con un sustituyente diferente.

Los nucleótidos alternativos pueden incluir la sustitución total de un resto fosfato inalterado con otro enlace internucleósido como se describe en el presente documento. Ejemplos de grupos fosfato alternativos incluyen, pero no se limitan a, fosforotioato, fosforoselenatos, boranofosfatos, ésteres de boranofosfato, hidrogenofosfonatos, fosforamidatos, fosforodiamidatos, alquil o arilfosfonatos y fosfotriésteres. Los fosforoditioatos tienen ambos oxígenos no enlazantes reemplazados por azufre. El enlace de fosfato también puede alterarse mediante la sustitución de un oxígeno de enlace con nitrógeno (fosforamidatos con puente), azufre (fosforotioatos con puente) y carbono (métlenfosfonatos con puente).

Los nucleósidos y nucleótidos alternativos pueden incluir el reemplazo de uno o más de los oxígenos no puente con un resto de borano (BH_3), azufre (tio), metilo, etilo y/o metoxi. Como ejemplo no limitante, dos oxígenos no puente en la misma posición (*por ejemplo*, la posición alfa (α), beta (β) o gamma (γ)) pueden reemplazarse con un azufre (tio) y un metoxi.

Se proporciona el reemplazo de uno o más de los átomos de oxígeno en la posición α de la fracción de fosfato (*por ejemplo*, α -tiofosfato) para conferir estabilidad (por ejemplo contra exonucleasas y endonucleasas) al ARN y al ADN a través de los enlaces de la cadena principal de fosforotioato no naturales. El ADN y el ARN de fosforotioato tienen una mayor resistencia a las nucleasas y, posteriormente, una semivida más prolongada en un entorno celular.

En el presente documento se describen otros enlaces internucleósidos que pueden emplearse de acuerdo con la presente divulgación, incluyendo los enlaces internucleósidos que no contienen un átomo de fósforo.

30 *Sitios de entrada de los ribosomas internos*

Los polinucleótidos pueden contener un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES). Un IRES puede actuar como el único sitio de unión al ribosoma, o puede servir como uno de los múltiples sitios de unión al ribosoma de un ARNm. Un polinucleótido que contiene más de un sitio de unión de ribosomas funcional puede codificar varios péptidos o polipéptidos que son traducidos independientemente por los ribosomas (*por ejemplo*, ARNm multicistrónico). Cuando los polinucleótidos se proporcionan con un IRES, además se proporciona opcionalmente una segunda región traducible. Los ejemplos de secuencias IRES que se pueden utilizar según la presente divulgación incluyen, sin limitación, aquellos de picornavirus (*por ejemplo*, FMDV), virus de plagas (CFFV), virus de la polio (PV), virus de la encefalomiocarditis (ECMV), virus de la fiebre aftosa (FMDV), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la peste porcina clásica (CSFV), virus de la leucemia murina (MLV), virus de la inmunodeficiencia de los simios (SIV) o virus de la parálisis del grillo (CrPV).

Estructura de 5'-cap

45 Un polinucleótido (*por ejemplo*, un ARNm) puede incluir una estructura de 5'-cap. La estructura de 5'-cap de un polinucleótido está involucrada en la exportación nuclear y en el aumento de la estabilidad del polinucleótido y se une a la proteína de unión del casquete del ARNm (CBP), que es responsable de la estabilidad del polinucleótido en la célula y de la competencia de traducción a través de la asociación de CBP con la proteína de unión de poli-A para formar las especies de ARNm cíclico maduro. El casquete ayuda además a la eliminación de los intrones proximales 5' durante el empalme del ARNm.

55 Las moléculas de polinucleótidos endógenos pueden tener un extremo 5' protegido, lo que genera un enlace 5'-ppp-5'-trifosfato entre un residuo de casquete de guanosina terminal y el nucleótido de sentido transcrita 5'-terminal del polinucleótido. Esta casquete de 5'-guanilato puede a continuación metilarse para generar un residuo de N7-metil-guanilato. Los azúcares de ribosa de los nucleótidos transcritos terminales y/o anteterminales del extremo 5' del polinucleótido también pueden estar opcionalmente metilados en 2'-O. La descapsulación en 5' a través de la hidrólisis y escisión de la estructura del casquete de guanilato puede apuntar a una molécula de polinucleótido, tal como una molécula de ARNm, para su degradación.

60 Las alteraciones de los polinucleótidos pueden generar una estructura de casquete no hidrolizable que impida la desprotección y aumente así la vida media del polinucleótido. Debido a que la hidrólisis de la estructura del casquete requiere la escisión de los enlaces fosforodiéster 5'-ppp-5', se pueden utilizar nucleótidos alternativos durante la reacción de tapado. Por ejemplo, se puede usar una enzima de protección Vaccinia de New England Biolabs (Ipswich, MA) con nucleótidos de α -tioguanosina según las instrucciones del fabricante para crear un enlace fosforotioato en el casquete 5'-ppp-5'. Se pueden utilizar nucleótidos de guanosina alternativos adicionales, como los nucleótidos de α -metil-fosfonato y seleno-fosfato.

Las alteraciones adicionales incluyen, pero no se limitan a, la 2'-O-metilación de los azúcares ribosa de los nucleótidos 5'-terminales y/o 5'-anteterminales del polinucleótido (como se mencionó anteriormente) en el grupo 2'-hidroxi del azúcar. Se pueden utilizar múltiples estructuras de 5'-cap distintas para generar el 5'-cap de un polinucleótido, tal como una molécula de ARNm.

5 Las estructuras de 5'-cap incluyen aquellas descritas en las publicaciones de patentes internacionales números WO2008127688, WO 2008016473 y WO 2011015347.

10 Análogos de casquete, que en esta invención también se denominan análogos de casquete sintético, casquetes químicos, análogos de casquete químico o análogos de casquetes estructurales o funcionales, difieren de las casquetes 5' naturales (es decir, endógenas, de tipo salvaje o fisiológicas) en su estructura química, manteniendo la función de casquete. Los análogos de casquete pueden sintetizarse químicamente (es decir, no enzimáticamente) o enzimáticamente y/o unirse a un polinucleótido.

15 Por ejemplo, el casquete del análogo de casquete anti-reversa (ARCA) contiene dos guanosinas unidas por un grupo 5'-5'-trifosfato, donde una guanosina contiene un grupo N7-metilo así como un grupo 3'-O-metilo (es decir, N7,3'-O-dimetil-guanosina-5'-trifosfato-5'-guanosina, m⁷G-3'mppp-G, que puede designarse de manera equivalente 3' O-Me-m7G(5')PPP(5')G). El átomo 3'-O de la otra guanosina inalterada se une al nucleótido 5'-terminal del polinucleótido protegido (*por ejemplo*, un ARNm). La guanosina N7 y 3'-O-metilada proporciona la fracción terminal del polinucleótido protegido (*por ejemplo*, ARNm).

Otro ejemplo de capuchón es mCAP, que es similar a ARCA pero tiene un grupo 2'-O-metilo en la guanosina (es decir, N7,2'-O-dimetil-guanosina-5'-trifosfato-5'-guanosina, m⁷Gm-PPP-G).

20 25 Un casquete puede ser un análogo de casquete dinucleótido. Como ejemplo no limitante, el análogo del casquete de dinucleótidos puede modificarse en diferentes posiciones de fosfato con un grupo boranofosfato o un grupo fosforoselenoato, como los análogos de casquete de dinucleótidos descritos en la patente de EE. UU. N.º 8,519,110.

30 35 Alternativamente, un análogo de casquete puede ser un análogo de casquete de dinucleótido sustituido con N7-(4-clorofenoxietilo) conocido en la técnica y/o descrito en el presente documento. Los ejemplos no limitantes de una forma de dinucleótido sustituido con N7-(4-clorofenoxietilo) de un análogo de casquete incluyen un análogo de casquete N7-(4-clorofenoxietil)-G(5')PPP(5')G y N7-(4-clorofenoxietil)-m3'-OG(5')PPP(5')G (*véase, por ejemplo*, los diversos análogos de casquete y los procedimientos de síntesis de análogos de casquete descritos en Kore et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2013 21:4570-4574). En otros casos, un análogo de casquete útil en los polinucleótidos de la presente divulgación es un análogo de 4-cloro/bromofenoxietilo.

40 45 Si bien los análogos de casquete permiten la protección concomitante de un polinucleótido o una región del mismo, en una reacción de transcripción *in vitro*, hasta el 20 % de las transcripciones permanecen sin protección. Esto, así como las diferencias estructurales de un análogo de casquete con respecto a las estructuras de 5'-cap endógenas de polinucleótidos producidos por la maquinaria de transcripción celular endógena, pueden conducir a una menor competencia traduccional y una menor estabilidad celular.

50 55 Los polinucleótidos alternativos también pueden ser protegidos postranscripcionalmente, utilizando enzimas, para generar estructuras de 5'-cap más auténticas. Tal y como se usa en el presente documento, la frase "más auténtico" se refiere a una característica que refleja estrechamente o imita, estructural o funcionalmente, una característica endógena o de tipo natural. Es decir, una característica "más auténtica" es mejor representativa de una función y/o estructura celular endógena, de tipo salvaje, natural o fisiológica en comparación con características sintéticas o análogas de la técnica anterior, o que supera la característica endógena, de tipo salvaje, natural o fisiológica correspondiente en uno o más aspectos. Ejemplos no limitantes de estructuras de 5'-cap más auténticas útiles en los polinucleótidos de la presente divulgación son aquellos que, entre otras cosas, tienen una unión mejorada de las proteínas de unión de casquete, una vida media aumentada, una susceptibilidad reducida a las 5'-endonucleasas y/o una desprotección 5' reducida, en comparación con las estructuras de casquete 5' sintéticas conocidas en la técnica (o con una estructura de casquete 5' natural o fisiológica de tipo salvaje). Por ejemplo, la enzima de protección del virus vaccinia recombinante y la enzima 2'-O-metiltransferasa recombinante pueden crear un enlace canónico 5'-5'-trifosfato entre el nucleótido 5'-terminal de un polinucleótido y un nucleótido de protección de guanosina, en donde la guanosina de protección contiene una metilación N7 y el nucleótido 5'-terminal del polinucleótido contiene un 2'-O-metilo. Dicha estructura se denomina estructura Cap1. Esta capa da como resultado una mayor competencia traduccional, estabilidad celular y una activación reducida de las citocinas proinflamatorias celulares, en comparación, *por ejemplo*, a otras estructuras análogas de 5'-cap conocidas en la técnica. Otras estructuras de capuchón ejemplares incluyen 7mG(5')PPP(5')N,pN2p (Cap 0), 7mG(5')PPP(5')NlmpNp (Cap 1), 7mG(5')-PPP(5')NlmpN2mp (Cap 2), y m(7)Gpppm(3)(6,6,2')Apm(2')Apm(2')Cpm(2)(3,2')Up (Cap 4).

Debido a que los polinucleótidos alternativos pueden ser protegidos postranscripcionalmente, y debido a que este proceso es más eficiente, casi el 100 % de los polinucleótidos alternativos pueden ser protegidos. Esto contrasta con el ~80 % cuando un análogo de casquete se une a un polinucleótido en el curso de una reacción de transcripción in vitro.

5

Los casquitos 5'-terminales pueden incluir casquitos endógenos o análogos de casquitos. Un casquete 5' terminal puede incluir un análogo de guanosina. Los análogos de guanosina útiles incluyen inosina, N1-metil-guanosina, 2'-fluoro-guanosina, 7-deaza-guanosina, 8-oxo-guanosina, 2-amino-guanosina, LNA-guanosina y 2-azido-guanosina.

10

En algunos casos, un polinucleótido contiene un 5'-cap modificado. Una modificación en el 5'-cap puede aumentar la estabilidad del polinucleótido, aumentar la vida media del polinucleótido y podría aumentar la eficiencia de traducción del polinucleótido. El 5'-cap modificado puede incluir, pero no se limita a, una o más de las siguientes modificaciones: modificación en la posición 2' y/o posición 3' de un trifosfato de guanosina (GTP) protegido, un reemplazo del oxígeno del anillo de azúcar (que produjo el anillo carbocíclico) con un resto de metileno (CH_2), una modificación en el resto del puente trifosfato de la estructura del casquete, o una modificación en el resto de nucleobase (G).

15

5'-UTR

20

Se puede proporcionar una 5'-UTR como región flanqueante a polinucleótidos (*por ejemplo*, ARNm). Un 5'-UTR puede ser homólogo o heterólogo a la región codificante que se encuentra en un polinucleótido. Pueden incluirse múltiples 5'-UTR en las regiones flanqueantes y pueden ser las mismas o de secuencias diferentes. Cualquier parte de las regiones flanqueantes, incluso ninguna, puede estar optimizada por codones y cualquiera de ellas puede contener independientemente una o más alteraciones estructurales o químicas diferentes, antes y/o después de la optimización por codones.

25

En la Tabla 21 de la Solicitud Provisional de EE. UU. N.º 61/775,509, y en la Tabla 21 y en la Tabla 22 de la Solicitud Provisional de EE. UU. N.º 61/829,372 se muestra una lista del sitio de inicio y de parada de 30 polinucleótidos alternativos (*por ejemplo*, ARNm). En la Tabla 21, cada 5'-UTR (5'-UTR-005 a 5'-UTR 68511) se identifica por su sitio de inicio y de finalización en relación con su transcripción nativa o de tipo salvaje (homóloga) (ENST; el identificador utilizado en la base de datos ENSEMBL).

35

Para alterar una o más propiedades de un polinucleótido (*por ejemplo*, ARNm), se pueden diseñar 5'-UTR que sean heterólogos a la región codificante de un polinucleótido alternativo (*por ejemplo*, ARNm). Luego, los polinucleótidos (*por ejemplo*, ARNm) pueden administrarse a células, tejidos u organismos y pueden medirse resultados como el nivel de proteína, la localización y/o la vida media para evaluar los efectos beneficiosos que el 5'-UTR heterólogo puede tener sobre los polinucleótidos alternativos (ARNm). Se pueden utilizar variantes de los 5'-UTR en las que se agregan o eliminan uno o más nucleótidos de los extremos, incluidos A, T, C o G.

40

Los 5'-UTR también se pueden optimizar en codones o alterar de cualquier manera descrita en el presente documento.

5'-UTR, 3'-UTR y elementos potenciadores de la traducción (TEE)

45

El 5'-UTR de un polinucleótido (*por ejemplo*, ARNm) puede incluir al menos un elemento potenciador de la traducción. El término "elemento potenciador de la traducción" se refiere a secuencias que aumentan la cantidad de polipéptido o proteína producida a partir de un polinucleótido. Como ejemplo no limitante, el TEE puede ubicarse entre el promotor de la transcripción y el codón de inicio. Los polinucleótidos (*por ejemplo*, ARNm) con al menos un TEE en el 5'-UTR pueden incluir un casquete en el 5'-UTR. Además, al menos un TEE 50 puede estar ubicado en el 5'-UTR de polinucleótidos (*por ejemplo*, ARNm) que experimentan traducción dependiente del casquete o independiente del casquete.

55

En un aspecto, los TEE son elementos conservados en el UTR que pueden promover la actividad traduccional de un polinucleótido como, pero no se limitan a, la traducción dependiente o independiente del casquete. La conservación de estas secuencias ha sido previamente demostrada por Panek et al. (Nucleic Acids Research, 2013, 1-10) en 14 especies, incluidos los humanos.

En un ejemplo no limitante, los TEE conocidos pueden estar en el líder 5' de la proteína homeodominio Gtx. (Chappell et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:9590-9594, 2004).

60

En otro ejemplo no limitante, los TEE se divulan en las Publicaciones de Patente de EE. UU. N.ºs 2009/0226470 y 2013/0177581, Publicaciones de Patente Internacional N.ºs WO2009/075886, WO2012/009644 y WO1999/024595, y Patentes de EE. UU. N.ºs 6,310,197 y 6,849,405.

65

En otro ejemplo no limitante, el TEE puede ser un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES), HCV-IRES o un elemento IRES como, pero no se limitan a, aquellos descritos en los documentos la Patente de EE. UU. N.º

- 7,468,275, la Publicación de Patente de EE. UU. N.^os 2007/0048776 y 2011/0124100 y publicaciones de patentes internacionales N.^os WO2007/025008 y WO2001/055369. Los elementos IRES pueden incluir, entre otros, las secuencias Gtx (*por ejemplo*, Gtx9-nt, Gtx8-nt, Gtx7-nt) descritas por Chappell et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 101:9590-9594, 2004) y Zhou et al. (PNAS 102:6273-6278, 2005) y en las Publicaciones de Patentes de EE. UU. N.^o US2007/0048776 y US2011/0124100 y la Publicación de Patente Internacional N.^o WO2007/025008.

Los "polinucleótidos potenciadores de la traducción" son polinucleótidos que incluyen uno o más de los TEE específicos ejemplificados en este documento y/o divulgados en la técnica (*véase por ejemplo*, la Patente de EE. UU. N.^o 6,310,197, 6,849,405, 7,456,273, 7,183,395, las Publicaciones de Patentes de EE. UU. N.^o 2009/0226470, 2007/0048776, 2011/0124100, 2009/0093049, 2013/0177581, la Publicación de Patente Internacional N.^os WO2009/075886, WO2007/025008, WO2012/009644, WO2001/055371 WO1999/024595, y la Patente Europea N.^os 2610341 y 2610340) o sus variantes, homólogos o derivados funcionales. Una o varias copias de un TEE específico pueden estar presentes en un polinucleótido (*por ejemplo*, ARNm). Los TEE en los polinucleótidos que mejoran la traducción se pueden organizar en uno o más segmentos de secuencia. Un segmento de secuencia puede albergar uno o más de los TEE específicos ejemplificados en esta invención, estando presente cada TEE en una o más copias. Cuando están presentes múltiples segmentos de secuencia en un polinucleótido que mejora la traducción, pueden ser homogéneos o heterogéneos. Por lo tanto, los múltiples segmentos de secuencia en un polinucleótido que mejora la traducción pueden albergar tipos idénticos o diferentes de los TEE específicos ejemplificados en esta invención, un número idéntico o diferente de copias de cada uno de los TEE específicos, y/o organización idéntica o diferente de los TEE dentro de cada segmento de secuencia.

Un polinucleótido (*por ejemplo*, ARNm) puede incluir al menos una TEE que se describe en las Publicaciones de Patentes Internacionales N.^o WO1999/024595, WO2012/009644, WO2009/075886, WO2007/025008, WO1999/024595, las Publicaciones de Patentes Europeas N.^os 2610341 y 2610340, Patentes de EE. UU. N.^os 6,310,197, 6,849,405, 7,456,273, 7,183,395, y Publicaciones de patentes de EE. UU. N.^o 2009/0226470, 2011/0124100, 2007/0048776, 2009/0093049, y 2013/0177581. El TEE puede estar ubicado en el 5'-UTR de los polinucleótidos (*por ejemplo*, ARNm).

Un polinucleótido (*por ejemplo*, ARNm) puede incluir al menos un TEE que tenga al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % de identidad con los TEE descritos en la Publicaciones de patentes de EE. UU. N.^o 2009/0226470, 2007/0048776, 2013/0177581 y 2011/0124100, Publicaciones de Patentes Internacionales núms. WO1999/024595, WO2012/009644, WO2009/075886 y WO2007/025008, las Publicaciones de patentes europeas N.^os 2610341 y 2610340, Patentes de EE. UU. N.^os 6,310,197, 6,849,405, 7,456,273, 7,183,395.

La 5'-UTR de un polinucleótido (*por ejemplo*, ARNm) puede incluir al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 55 o más de 60 secuencias TEE. Las secuencias TEE en el 5'-UTR de un polinucleótido (*por ejemplo*, ARNm) pueden ser las mismas o diferentes secuencias TEE. Las secuencias TEE pueden seguir un patrón como ABABAB, AABBAABBAABB o ABCABCABC, o variantes de los mismos, repetidos una, dos o más de tres veces. En estos patrones, cada letra, A, B o C representa una TEE diferente a nivel de nucleótidos.

En algunos casos, el 5'-UTR puede incluir un espaciador para separar dos secuencias TEE. Como ejemplo no limitante, el espaciador puede ser un espaciador de 15 nucleótidos y/u otros espaciadores conocidos en la técnica. Como otro ejemplo no limitante, la 5'-UTR puede incluir un módulo espaciador de secuencia TEE repetido al menos una vez, al menos dos veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces o más de 9 veces en la 5'-UTR.

En otros casos, el espaciador que separa dos secuencias TEE puede incluir otras secuencias conocidas en la técnica que pueden regular la traducción de los polinucleótidos (*por ejemplo*, ARNm) de la presente divulgación tales como, pero sin limitarse a, secuencias de miR (*por ejemplo*, sitios de unión de miR y semillas de miR). Como ejemplo no limitante, cada espaciador usado para separar dos secuencias TEE puede incluir una secuencia miR diferente o un componente de una secuencia miR (*por ejemplo*, secuencia semilla miR).

En algunos casos, el TEE en el 5'-UTR de un polinucleótido (*por ejemplo*, ARNm) puede incluir al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o más del 99 % de las secuencias de TEE divulgadas en las Publicaciones de Patentes de EE. UU. N.^o 2009/0226470, 2007/0048776, 2013/0177581 y 2011/0124100,

Publicaciones de Patentes Internacionales N.^{os} WO1999/024595, WO2012/009644, WO2009/075886 y WO2007/025008, las Publicaciones de Patentes Europeas N.^{os} 2610341 y 2610340, y Patente de EE. UU. N.os 6,310,197, 6,849,405, 7,456,273, y 7,183,395. En otra realización, el TEE en el 5'-UTR de los polinucleótidos (*por ejemplo*, ARNm) de la presente divulgación 5 puede incluir un fragmento de 5-30 nucleótidos, un fragmento de 5-25 nucleótidos, un fragmento de 5-20 nucleótidos, un fragmento de 5-15 nucleótidos, un fragmento de 5-10 nucleótidos de las secuencias TEE divulgadas en las Publicaciones de patentes de EE. UU. N.^o 2009/0226470, 2007/0048776, 2013/0177581 y 2011/0124100, las Publicaciones de Patentes Internacionales 10 N.^{os} WO1999/024595, WO2012/009644, WO2009/075886 y WO2007/025008, Publicaciones de patentes europeas N.^o 2610341 y 2610340, y Patentes de EE.UU. N.os 6,310,197, 6,849,405, 7,456,273, y 7,183,395.

En ciertos casos, el TEE en el 5'-UTR de los polinucleótidos (*por ejemplo*, ARNm) de la presente divulgación 15 puede incluir al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o más del 99 % de las secuencias TEE divulgadas en Chappell et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:9590-9594, 2004) y Zhou et al. (PNAS 102:6273-6278, 2005), in Supplemental Table 1 y in Supplemental Table 2 divulgado por Wellensiek et al (Genome-wide profiling of human cap-independent translation-enhancing elements, Nature Methods, 2013; DOI:10.1038/NMETH.2522). En otra realización, el TEE en el 5'-UTR de los 20 polinucleótidos (*por ejemplo*, ARNm) de la presente divulgación puede incluir un fragmento de 5-30 nucleótidos, un fragmento de 5-25 nucleótidos, un fragmento de 5-20 nucleótidos, un fragmento de 5-15 nucleótidos, un fragmento de 5-10 nucleótidos de las secuencias TEE divulgadas en Chappell et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:9590-9594, 2004) y Zhou et al. (PNAS 102:6273-6278, 2005), in Supplemental Table 1 y in Supplemental 25 Table 2 divulgados por Wellensiek et al (Genome-wide profiling of human cap-independent translation-enhancing elements, Nature Methods, 2013; DOI:10.1038/NMETH.2522).

En algunos casos, el TEE utilizado en el 5'-UTR de un polinucleótido (*por ejemplo*, ARNm) es una secuencia IRES como, pero no se limitan a, las descritas en la patente de EE. UU. N.^o 7,468,275 y la Publicación de Patente Internacional N.^o WO2001/055369. 30

En algunos casos, los TEE utilizados en el 5'-UTR de un polinucleótido (*por ejemplo*, ARNm) pueden identificarse mediante los métodos descritos en la Publicación de Patente de EE. UU. N.^{os} 2007/0048776 y 2011/0124100 y la Publicación de Patente Internacional N.^{os} WO2007/025008 y WO2012/009644.

En algunos casos, los TEE utilizados en el 5'-UTR de un polinucleótido (*por ejemplo*, ARNm) de la presente divulgación pueden ser un elemento regulador de la transcripción descrito en la patente de EE. UU. N.^{os} 7,456,273 y 7,183,395, la Publicación de Patente de EE. UU. N.^o 2009/0093049, y la Publicación de Patente Internacional N.^o WO2001/055371. Los elementos reguladores de la transcripción pueden identificarse mediante métodos conocidos en la técnica, tales como, pero no se limitan a, los métodos descritos en la patente 40 de EE. UU. N.^{os} 7,456,273 y 7,183,395, la Publicación de Patente de EE. UU. N.^o 2009/0093049, la Publicación Internacional N.^o WO2001/055371.

En otros casos, el TEE utilizado en el 5'-UTR de un polinucleótido (*por ejemplo*, ARNm) es un polinucleótido o parte del mismo como se describe en la patente de EE. UU. N.^{os} 7,456,273 y 7,183,395, la Publicación de Patente de EE. UU. N.^o 2009/0093049, y la Publicación Internacional N.^o WO2001/055371. 45

El 5'-UTR que incluye al menos un TEE descrito en este documento puede incorporarse en una secuencia monocistrónica tal como, pero no se limita a, un sistema vectorial o un vector de polinucleótido. Como ejemplo no limitante, los sistemas vectoriales y vectores de polinucleótidos pueden incluir aquellos descritos en la patente de EE. UU. N.^{os} 7,456,273 y 7,183,395, la Publicación de Patente de EE. UU. N.^{os} 2007/0048776, 2009/0093049 y 2011/0124100, y la Publicación Internacional N.^{os} WO2007/025008 y WO2001/055371. 50

Los TEE descritos en este documento pueden estar ubicados en el 5'-UTR y/o el 3'-UTR de los polinucleótidos (*por ejemplo*, ARNm). Los TEE ubicados en la 3'-UTR pueden ser los mismos y/o diferentes de los TEE ubicados y/o descritos para su incorporación en la 5' -UTR. 55

En algunos casos, la 3'-UTR de un polinucleótido (*por ejemplo*, ARNm) puede incluir al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18 al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 55 o más de 60 secuencias TEE. Las secuencias TEE en el 3'-UTR de los polinucleótidos (*por ejemplo*, ARNm) de la presente divulgación pueden ser las mismas o diferentes secuencias TEE. Las secuencias TEE pueden seguir un patrón como ABABAB, AABBAABBAABB o ABCABCABC, o variantes de los mismos, repetidos una, dos o más de tres veces. En estos patrones, cada 60 letra, A, B o C representa una TEE diferente a nivel de nucleótidos. 65

En un caso, el 3'-UTR puede incluir un espaciador para separar dos secuencias TEE. Como ejemplo no limitante, el espaciador puede ser un espaciador de 15 nucleótidos y/u otros espaciadores conocidos en la técnica. Como otro ejemplo no limitante, la 3'-UTR puede incluir un módulo espaciador de secuencia TEE repetido al menos una vez, al menos dos veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al 5 menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces o más de 9 veces en la 3'-UTR.

En otros casos, el espaciador que separa dos secuencias TEE puede incluir otras secuencias conocidas en la técnica que pueden regular la traducción de los polinucleótidos (*por ejemplo*, ARNm) de la presente divulgación tales como, pero sin limitarse a, secuencias de miR descritas en este documento (*por ejemplo*, sitios de unión 10 de miR y semillas de miR). Como ejemplo no limitante, cada espaciador usado para separar dos secuencias TEE puede incluir una secuencia miR diferente o un componente de una secuencia miR (*por ejemplo*, secuencia semilla miR).

En otros casos, la incorporación de una secuencia miR y/o una secuencia TEE cambia la forma de la región 15 del bucle del tallo, lo que puede aumentar y/o disminuir la traducción (véase por ejemplo, Kedde et al. A Pumilio-induced RNA structure switch in p27-3'UTR controls miR-221 y miR-22 accessibility. *Nature Cell Biology*. 2010).

Bucle de tallo

20 Los polinucleótidos (*por ejemplo*, ARNm) pueden incluir un bucle de tallo tal como, pero no se limita a, un bucle de tallo de histona. El bucle de tallo puede ser una secuencia de nucleótidos que tiene aproximadamente 25 o aproximadamente 26 nucleótidos de longitud, tales como, pero no se limita a, aquellas descritas en la Publicación de Patente Internacional N.º WO2013/103659. El bucle de tallo de histona puede ubicarse en 3' con respecto a la región de codificación (*por ejemplo*, en el extremo 3' de la región de codificación). Como 25 ejemplo no limitante, el bucle de tallo puede estar ubicado en el extremo 3' de un polinucleótido descrito en el presente documento. En algunos casos, un polinucleótido (*por ejemplo*, un ARNm) incluye más de un bucle de tallo (*por ejemplo*, dos bucles de tallo). Se describen ejemplos de secuencias de bucle de tallo en las publicaciones de patente internacionales N.º WO2012/019780 y WO201502667. En algunos casos, un 30 polinucleótido incluye la secuencia de tallo y bucle CAAAGGCTTTTCAGAGCCACCA (SEQ ID NO: 1). En otros, un polinucleótido incluye la secuencia de bucle de tallo CAAAGGCUCUUUCAGAGCCACCA (SEQ ID NO: 2).

Un bucle de tallo puede estar ubicado en una segunda región terminal de un polinucleótido. Como ejemplo no limitante, la horquilla puede ubicarse dentro de una región no traducida (*por ejemplo*, 3'-UTR) en la segunda 35 región terminal.

En algunos casos, un polinucleótido tal como, pero no se limita a, ARNm, que incluye el bucle de tallo de histona puede estabilizarse mediante la adición de una región estabilizadora 3' (*por ejemplo*, una región estabilizadora 3' que incluye al menos un nucleósido de terminación de cadena). Sin querer limitarnos a la teoría, la adición 40 de al menos un nucleósido de terminación de cadena puede retardar la degradación de un polinucleótido y, por lo tanto, puede aumentar la vida media del polinucleótido.

En otros casos, un polinucleótido como, pero no limitado a, ARNm, que incluye el bucle del tallo de la histona, 45 puede estabilizarse mediante una alteración en la región 3' del polinucleótido que puede prevenir y/o inhibir la adición de oligo(U) (véase *por ejemplo*, Publicación Internacional de Patente No. WO2013/103659).

En otros casos, un polinucleótido tal como, pero no se limita a, ARNm, que incluye el bucle del tallo de la histona, se puede estabilizar mediante la adición de un oligonucleótido que termina en un 3'-desoxinucleósido, 50 2',3'-didesoxinucleósido, 3'-O-metilnucleósidos, 3'-O-etilnucleósidos, 3'-arabinósidos y otros nucleósidos alternativos conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento.

En algunos casos, los polinucleótidos de la presente divulgación pueden incluir un bucle de tallo de histona, una región poli-A y/o una estructura de 5'-cap. El bucle del tallo de la histona puede estar antes y/o después 55 de la región poli-A. Los polinucleótidos que incluyen el bucle de tallo de histona y una secuencia de región poli-A pueden incluir un nucleósido de terminación de cadena descrito en el presente documento.

En otros casos, los polinucleótidos de la presente divulgación pueden incluir un bucle de tallo de histona y una estructura de 5'-cap. La estructura de 5'-cap puede incluir, pero no se limita a, aquellas descritas en el presente 60 documento y/o conocidas en la técnica.

En algunos casos, la región de bucle de tallo conservada puede incluir una secuencia miR descrita en el presente documento. Como ejemplo no limitante, la región de bucle de tallo puede incluir la secuencia semilla de una secuencia de miR descrita en el presente documento. En otro ejemplo no limitante, la región del bucle del tallo puede incluir una secuencia semilla miR-122.

65 En ciertos casos, la región de bucle de tallo conservada puede incluir una secuencia miR descrita en el presente

documento y también puede incluir una secuencia TEE.

En algunos casos, la incorporación de una secuencia miR y/o una secuencia TEE cambia la forma de la región del bucle del tallo, lo que puede aumentar y/o disminuir la traducción (véase, por ejemplo, Kedde et al. A 5 Pumilio-induced RNA structure switch in p27-3'UTR controls miR-221 y miR-22 accessibility. *Nature Cell Biology*. 2010).

Los polinucleótidos pueden incluir al menos un tallo-bucle de histona y una región poli-A o una señal de poliadenilación. Ejemplos no limitantes de secuencias de polinucleótidos que codifican al menos un tallo-bucle de histona y una región poli-A o una señal de poliadenilación se describen en la Publicación de Patente Internacional 10 N.º WO2013/120497, WO2013/120629, WO2013/120500, WO2013/120627, WO2013/120498, WO2013/120626, WO2013/120499 y WO2013/120628. En ciertos casos, el polinucleótido que codifica un bucle de tallo de histona y una región poli-A o una señal de poliadenilación puede codificar un antígeno patógeno o un fragmento 15 del mismo, como las secuencias de polinucleótidos descritas en la Publicación de Patente Internacional N.º WO2013/120499 y WO2013/120628. En un caso, el ácido nucleico que codifica una horquilla de histona y una secuencia poli-A o una señal de poliadenilación puede codificar una proteína terapéutica como las secuencias de ácido nucleico descritas en la Publicación de Patente Internacional N.º WO2013/120497 y WO2013/120629. En algunos casos, el polinucleótido que codifica un bucle de tallo de 20 histona y una región poli-A o una señal de poliadenilación puede codificar un antígeno tumoral o un fragmento del mismo, como las secuencias de polinucleótidos descritas en la Publicación de Patente Internacional N.º WO2013/120500 y WO2013/120627. En otro caso, el ácido nucleico que codifica un bucle de tallo de histona y una secuencia poli-A o una señal de poliadenilación puede codificar un antígeno alergénico o un autoantígeno autoinmune como las secuencias de ácido nucleico descritas en la Publicación de Patente 25 Internacional N.º WO2013/120498 y WO2013/120626.

Regiones poli-A

Un polinucleótido o ácido nucleico (*por ejemplo*, un ARNm) puede incluir una secuencia poliA y/o una señal de poliadenilación. Una secuencia poliA puede estar compuesta total o mayoritariamente por nucleótidos de adenina o análogos o derivados de los mismos. Una secuencia de poliA puede ser una cola ubicada adyacente a una región 3' no traducida de un ácido nucleico. 30

Durante el procesamiento del ARN, normalmente se agrega una cadena larga de nucleótidos de adenosina (región poli-A) a las moléculas de ARN mensajero (ARNm) para aumentar la estabilidad de la molécula. Inmediatamente después de la transcripción, el extremo 3' de la transcripción se escinde para liberar un 3'-hidroxi. Luego, la polimerasa poli-A agrega una cadena de nucleótidos de adenosina al ARN. El proceso, llamado poliadenilación, agrega una región poli-A que tiene entre 100 y 250 residuos de longitud. 35

Las longitudes de región poli-A únicas pueden proporcionar ciertas ventajas a los polinucleótidos alternativos de la presente divulgación. 40

Generalmente, la longitud de una región poli-A de la presente divulgación es de al menos 30 nucleótidos de longitud. En otra realización, la región poli-A tiene al menos 35 nucleótidos de longitud. En otra realización, la longitud es de al menos 40 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 45 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 55 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 60 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 70 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 80 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 90 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 100 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 120 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 140 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 160 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 180 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 200 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 250 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 300 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 350 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 400 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 450 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 500 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 600 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 700 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 800 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 900 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1000 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1100 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1200 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1300 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1400 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1500 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1600 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1700 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1800 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1900 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 2000 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 2500 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 3000 nucleótidos. 45 50 55 60 65

En algunos casos, la región poli-A puede tener una longitud de 80 nucleótidos, 120 nucleótidos o 160 nucleótidos en una molécula de polinucleótido alternativa descrita en el presente documento.

- 5 En otros casos, la región poli-A puede tener 20, 40, 80, 100, 120, 140 o 160 nucleótidos de longitud en una molécula de polinucleótido alternativa descrita en el presente documento.

En algunos casos, la región poli-A está diseñada en relación con la longitud del polinucleótido alternativo general. Este diseño puede basarse en la longitud de la región codificante del polinucleótido alternativo, en la 10 longitud de una característica o región particular del polinucleótido alternativo (tal como el ARNm) o en la longitud del producto final expresado a partir del polinucleótido alternativo. Cuando se relaciona con cualquier característica del polinucleótido alternativo (*por ejemplo*, distinta de la parte de ARNm que incluye la región poli-A), la región poli-A puede ser 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 % mayor en longitud que la característica adicional. La región poli-A también puede diseñarse como una fracción del polinucleótido 15 alternativo al que pertenece. En este contexto, la región poli-A puede ser 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 % o más de la longitud total del constructo o la longitud total del constructo menos la región poli-A.

En ciertos casos, se pueden utilizar sitios de unión diseñados y/o la conjugación de polinucleótidos (*por ejemplo*, ARNm) para la proteína de unión de poli-A para mejorar la expresión. Los sitios de unión diseñados 20 pueden ser secuencias de sensores que pueden funcionar como sitios de unión para ligandos del microambiente local de los polinucleótidos (*por ejemplo*, ARNm). Como ejemplo no limitante, los polinucleótidos (*por ejemplo*, ARNm) pueden incluir al menos un sitio de unión diseñado para alterar la afinidad de unión de la proteína de unión de poli-A (PABP) y análogos de la misma. La incorporación de al menos un sitio de unión 25 diseñado puede aumentar la afinidad de unión de la PABP y análogos de los mismos.

Adicionalmente, múltiples polinucleótidos distintos (*por ejemplo*, ARNm) se pueden unir entre sí a la PABP 30 (proteína de unión a poli-A) a través del extremo 3' utilizando nucleótidos alternativos en el extremo 3' de la región poli-A. Los experimentos de transfección se pueden realizar en líneas celulares relevantes y la producción de proteínas se puede analizar mediante ELISA a las 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas y el día 7 después de la transfección. Como ejemplo no limitante, los experimentos de transfección pueden usarse para evaluar el efecto sobre la afinidad de unión de PABP o análogos de los mismos como resultado de la adición de al menos un sitio de unión diseñado.

En ciertos casos, se puede utilizar una región poli-A para modular el inicio de la traducción. Sin querer limitarnos 35 a la teoría, la región poli-A recluta PABP, que a su vez puede interactuar con el complejo de iniciación de la traducción y, por lo tanto, puede ser esencial para la síntesis de proteínas.

En algunos casos, también se puede utilizar una región poli-A en la presente divulgación para proteger contra la digestión con exonucleasa 3'-5'.

40 En algunos casos, un polinucleótido (*por ejemplo*, ARNm) puede incluir un cuarteto poliA-G. El cuarteto G es una matriz cíclica de cuatro nucleótidos de guanosina unidos por enlaces de hidrógeno que pueden formarse mediante secuencias ricas en G tanto en el ADN como en el ARN. En esta realización, el cuarteto G se incorpora al final de la región poli-A. Los polinucleótidos resultantes (*por ejemplo*, ARNm) pueden analizarse 45 para determinar su estabilidad, producción de proteínas y otros parámetros, incluyendo la vida media en varios puntos temporales. Se ha descubierto que el cuarteto poliA-G da como resultado una producción de proteínas equivalente a al menos el 75 % de la observada utilizando solo una región poli-A de 120 nucleótidos.

50 En algunos casos, un polinucleótido (*por ejemplo*, ARNm) puede incluir una región poli-A y puede estabilizarse mediante la adición de una región estabilizante 3'. Los polinucleótidos (*por ejemplo*, ARNm) con una región poli-A pueden incluir además una estructura de 5'-cap.

55 En otros casos, un polinucleótido (*por ejemplo*, ARNm) puede incluir un cuarteto de poli-A-G. Los polinucleótidos (*por ejemplo*, ARNm) con un cuarteto poli-A-G pueden incluir además una estructura de 5'-cap.

En algunos casos, la región estabilizadora 3' que se puede utilizar para estabilizar un polinucleótido (*por ejemplo*, ARNm) que incluye una región poli-A o un cuarteto poli-A-G puede ser, pero no se limita a, aquellas 60 descritas en la Publicación de Patente Internacional N.º WO2013/103659. En otros casos, la región estabilizadora 3' que se puede utilizar con la presente divulgación incluye un nucleósido de terminación de cadena tal como 3'-desoxiadenosina (cordicepina), 3'-desoxiuridina, 3'-desoxicitosina, 3'-desoxiguanosina, 3'-desoxitimina, 2',3'-didesoxinucleósidos, tales como 2',3'-didesoxiadenosina, 2',3'-didesoxiuridina, 2',3'-didesoxicitosina, 2',3'-didesoxiguanosina, 2',3'-didesoxitimina, un 2'-desoxinucleósido o un O-metilnucleósido.

En otros casos, un polinucleótido tal como, pero no limitado a, ARNm, que incluye una región poliA o un cuarteto 65 poli-A-G puede estabilizarse mediante una alteración en la región 3' del polinucleótido que puede prevenir y/o inhibir la adición de oligo(U) (*véase, por ejemplo*, la publicación de patente internacional N.º WO2013/103659).

En otros casos, un polinucleótido tal como, pero no limitado a, ARNm, que incluye una región poli-A o un cuarteto poli-A-G se puede estabilizar mediante la adición de un oligonucleótido que termina en un 3'-desoxinucleósido, 2',3'-didesoxinucleósido, 3'-O-metilnucleósidos, 3'-O-etilnucleósidos, 3'-arabinósidos y otros nucleósidos alternativos conocidos en la técnica y/o descritos en este documento.

5

Nucleósidos que terminan la cadena

Un ácido nucleico puede incluir un nucleósido de terminación de cadena. Por ejemplo, un nucleósido de terminación de la cadena puede incluir aquellos nucleósidos desoxigenados en las posiciones 2' y/o 3' de su grupo azúcar. Dichas especies pueden incluir 3'-desoxiadenosina (cordicepina), 3'-desoxiuridina, 3'-desoxicitosina, 3'-desoxiguanosina, 3'-desoxitimidina y 2',3'-didesoxinucleósidos, tales como 2',3'-didesoxiadenosina, 2',3'-didesoxiuridina, 2',3'-didesoxicitosina, 2',3'-didesoxiguanosina y 2',3'-didesoxitimidina.

10 15 *Otros componentes*

Una composición de nanopartículas puede incluir uno o más componentes además de los descritos en las secciones anteriores. Por ejemplo, una composición de nanopartículas puede incluir una o más moléculas hidrófobas pequeñas tales como una vitamina (*por ejemplo*, vitamina A o vitamina E) o un esterol.

20 25 Las composiciones de nanopartículas también pueden incluir una o más moléculas mejoradoras de la permeabilidad, carbohidratos, polímeros, agentes alteradores de la superficie u otros componentes. Una molécula mejoradora de la permeabilidad puede ser una molécula descrita en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. N.º 2005/0222064, por ejemplo. Los carbohidratos pueden incluir azúcares simples (*por ejemplo*, glucosa) y polisacáridos (*por ejemplo*, glucógeno y derivados y análogos del mismo).

Se puede incluir un polímero y/o utilizar para encapsular o encapsular parcialmente una composición de nanopartículas. Un polímero puede ser biodegradable y/o biocompatible. Un polímero puede seleccionarse de, pero no está limitado a, poliaminas, poliéteres, poliamidas, poliésteres, policarbamatos, poliureas, 30 policarbonatos, poliestirenos, poliimidás, polisulfonas, poliuretanos, poliacetilenos, polietilenos, polietileniminas, poliisocianatos, poliacrilatos, polimetacrilatos, poliacrilonitrilos y poliarilatos. Por ejemplo, un polímero puede incluir poli(caprolactona) (PCL), polímero de etileno acetato de vinilo (EVA), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido L-láctico) (PLLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(ácido L-láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(D,L-lactida) (PDLA), poli(L-lactida) (PLLA), poli(D,L-lactida-co-caprolactona), poli(D,L-lactida-co-caprolactona-co-glicolida), poli(D,L-lactida-co-PEO-co-D,L-lactida), poli(D,L-lactida-co-PPO-co-D,L-lactida), cianoacrilato de polialquilo, poliuretano, poli-L-lisina (PLL), metacrilato de hidroxipropilo. (HPMA), polietilenglicol, ácido poli-L-glutámico, poli(hidroxiácidos), polianhídridos, poliortoésteres, poli(éster amidas), poliamidas, poli(éster éteres), policarbonatos, polialquilenos como polietileno y polipropileno, glicoles de polialquileno como poli(etilenglicol) (PEG), óxidos de polialquileno (PEO), tereftalatos de polialquileno como poli(tereftalato de etileno), alcoholes de polivinilo (PVA), éteres de polivinilo, ésteres de polivinilo como poli(acetato de vinilo), haluros de polivinilo como poli(cloruro de vinilo) (PVC), polivinilpirrolidona (PVP), polisiloxanos, poliestireno (PS), poliuretanos, celulosas derivatizadas como alquilcelulosas, hidroxialquilcelulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitrocelulosas, hidroxipropilcelulosas, carboximetilcelulosa, polímeros de ácidos acrílicos, como poli(metil(met)acrilato) (PMMA), poli(etil(met)acrilato), poli(butil(met)acrilato), poli(isobutil(met)acrilato), poli(hexil(met)acrilato), poli(isodecil(met)acrilato), poli(lauril(met)acrilato), poli(fenil(met)acrilato), poli(metil(acrilato), poli(isopropil(acrilato), poli(isobutil(acrilato), poli(octadecil(acrilato)) y copolímeros y mezclas de los mismos, polidioxanona y sus copolímeros, polihidroxialcanoatos, fumarato de polipropileno, polioximetileno, poloxámeros, polioxaminas, poli(ortho)ésteres, poli(ácido butírico), poli(ácido valérico), poli(lactida-co-caprolactona), carbonato de trimetileno, poli(*N*-acriolimorfolina) (PAcM), poli(2-metil-2-oxazolina) (PMOX), poli(2-etyl-2-oxazolina) (PEOZ) y poliglicerol.

55 Los agentes que alteran la superficie pueden incluir, pero no se limitan a, proteínas aniónicas (*por ejemplo*, albúmina sérica bovina), tensioactivos (*por ejemplo*, tensioactivos catiónicos como el bromuro de dimetildioctadecil-amonio), azúcares o derivados de azúcar (*por ejemplo*, ciclodextrina), ácidos nucleicos, polímeros (*por ejemplo*, heparina, polietilenglicol y poloxámero), agentes mucolíticos (*por ejemplo*, acetilcisteína, artemisa, bromelina, papaína, clerodendrum, bromhexina, carbocisteína, eprazinona, mesna, ambroxol, sobrerol, domiodol, letosteína, stepronina, tiopronina, gelsolina, timosina β_4 , dornasa alfa, neltenexina y erdosteína) y DNAsas (*por ejemplo*, rhDNAsa). Un agente alterador de superficie puede disponerse dentro de una nanopartícula y/o sobre la superficie de una composición de nanopartículas (*por ejemplo*, mediante recubrimiento, adsorción, enlace covalente u otro proceso).

60 65 Una composición de nanopartículas también puede comprender uno o más lípidos funcionalizados. Por ejemplo, un lípido puede estar funcionalizado con un grupo alquino que, cuando se expone a una azida en condiciones de reacción apropiadas, puede experimentar una reacción de cicloadición. En particular, una bicapa lipídica puede funcionalizarse de esta manera con uno o más grupos útiles para facilitar la permeación

de la membrana, el reconocimiento celular o la obtención de imágenes. La superficie de una composición de nanopartículas también puede conjugarse con uno o más anticuerpos útiles. Los grupos funcionales y conjugados útiles en la administración dirigida de células, la obtención de imágenes y la permeación de membranas son bien conocidos en la técnica.

5 Además de estos componentes, las composiciones de nanopartículas pueden incluir cualquier sustancia útil en composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, la composición de nanopartículas puede incluir uno o más excipientes o principios accesorios farmacéuticamente aceptables tales como, pero no limitados a, uno o más solventes, medios de dispersión, diluyentes, coadyuvantes de dispersión, coadyuvantes de suspensión, 10 coadyuvantes de granulación, desintegrantes, rellenos, deslizantes, vehículos líquidos, aglutinantes, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, agentes tampón, agentes lubricantes, aceites, conservantes y otras especies. También pueden incluirse excipientes como ceras, mantecas, colorantes, agentes de recubrimiento, saborizantes y agentes perfumantes. Los excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica (véase por ejemplo Remington's The Science y Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro; Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006).

15 Los ejemplos de diluyentes pueden incluir, pero no se limitan a, carbonato de calcio, carbonato de sodio, fosfato de calcio, fosfato dicálcico, sulfato de calcio, hidrogenofosfato de calcio, fosfato de sodio, lactosa, sacarosa, celulosa, celulosa microcristalina, caolín, manitol, sorbitol, inositol, cloruro de sodio, almidón seco, almidón de maíz, azúcar en polvo y/o combinaciones de los mismos. Los agentes granuladores y dispersantes pueden 20 seleccionarse de la lista no limitativa que consiste en almidón de patata, almidón de maíz, almidón de tapioca, glicolato de almidón sódico, arcillas, ácido algínico, goma guar, pulpa de cítricos, agar, bentonita, celulosa y productos de madera, esponja natural, resinas de intercambio catiónico, carbonato de calcio, silicatos, carbonato de sodio, polí(vinil-pirrolidona) reticulada (crospovidona), carboximetilalmidón sódico (glicolato de 25 almidón sódico), carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica reticulada (croscarmelosa), metilcelulosa, almidón pregelatinizado (almidón 1500), almidón microcristalino, almidón insoluble en agua, carboximetilcelulosa de calcio, silicato de aluminio y magnesio (VEEGUM®), laurilsulfato de sodio, compuestos de amonio cuaternario y/o combinaciones de los mismos.

30 Los agentes tensioactivos y/o emulsionantes pueden incluir, pero no se limitan a, emulsionantes naturales (*por ejemplo* acacia, agar, ácido algínico, alginato de sodio, tragacanto, condrex, colesterol, xantana, pectina, gelatina, yema de huevo, caseína, grasa de lana, colesterol, cera y lecitina), arcillas coloidales (*por ejemplo* bentonita [silicato de aluminio] y VEEGUM® [silicato de magnesio y aluminio]), derivados de aminoácidos de cadena larga, alcoholes de alto peso molecular (*por ejemplo* alcohol estearílico, alcohol cetílico, alcohol olefílico, 35 monoestearato de triacetina, diestearato de etilenglicol, monoestearato de glicerilo y monoestearato de propilenglicol, alcohol polivinílico), carbómeros (*por ejemplo* polimetileno carboxílico, ácido poliacrílico, polímero de ácido acrílico y polímero de carboxivinilo), carragenina, derivados celulosicos (*por ejemplo* carboximetilcelulosa sódica, celulosa en polvo, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmétilecelulosa, metilcelulosa), ésteres de ácidos grasos de sorbitán (*por ejemplo* monolaurato de sorbitán polioxietilenoado [TWEEN®20], 40 sorbitán polioxietilenoado [TWEEN® 60], polioxietileno sorbitán monooleato [TWEEN®80], sorbitán monopalmitato [SPAN®40], sorbitán monostearato [SPAN®60], sorbitán tristearato [SPAN®65], monooleato de glicerilo, sorbitán monooleato [SPAN®80]), ésteres de polioxietileno (*por ejemplo* monoestearato de polioxietileno [MYRJ® 45], aceite de ricino hidrogenado polioxietilenoado, aceite de ricino polietoxilado, estearato de polioximetílico y SOLUTOL®), ésteres de ácidos grasos de sacarosa, ésteres de ácidos grasos de 45 polietilenglicol (*por ejemplo*, CREMOPHOR®), éteres de polioxietileno (*por ejemplo*, éter laurílico de polioxietileno [BRIJ®30]), polí(vinilpirrolidona), monolaurato de dietilenglicol, oleato de trietanolamina, oleato de sodio, oleato de potasio, oleato de etilo, ácido oleico, laurato de etilo, laurilsulfato de sodio, PLUORINC®F 68, POLOXAMER®188, bromuro de cetrimonio, cloruro de cetilpiridinio, cloruro de benzalconio, docusato de sodio, etc. y/o combinaciones de los mismos.

50 Un agente aglutinante puede ser almidón (*por ejemplo*, almidón de maíz y pasta de almidón); gelatina; azúcares (*por ejemplo*, sacarosa, glucosa, dextrosa, dextrina, melaza, lactosa, lactitol, manitol); gomas naturales y sintéticas (*por ejemplo*, acacia, alginato de sodio, extracto de musgo de Irlanda, goma panwar, goma ghatti, mucílago de cáscaras de isapol, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmétilecelulosa, celulosa microcristalina, acetato de celulosa, polí(vinilpirrolidona), silicato de aluminio y magnesio (VEEGUM®) y arabogalactano de alerce); alginatos; óxido de polietileno; polietilenglicol; sales de calcio inorgánicas; ácido silícico; polimetacrilatos; ceras; agua; alcohol; y combinaciones de los mismos, o cualquier otro agente aglutinante adecuado.

60 Los ejemplos de conservantes pueden incluir, entre otros, antioxidantes, agentes quelantes, conservantes antimicrobianos, conservantes antifúngicos, conservantes de alcohol, conservantes ácidos y/u otros conservantes. Los ejemplos de antioxidantes incluyen, pero no se limitan a, alfa tocoferol, ácido ascórbico, palmitato de acorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, monotioglicerol, metabisulfito de potasio, ácido propiónico, galato de propilo, ascorbato de sodio, bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio y/o sulfito de sodio. Los ejemplos de agentes quelantes incluyen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico monohidrato, edetato disódico, edetato dipotásico, ácido edético, ácido fumárico, ácido málico, ácido fosfórico,

edetato de sodio, ácido tartárico y/o edetato trisódico. Los ejemplos de conservantes antimicrobianos incluyen, entre otros, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, bronopol, cetrimida, cloruro de cetilpiridinio, clorhexidina, clorobutanol, clorocresol, cloroxilenol, cresol, alcohol etílico, glicerina, hexetidina, imidurea, fenol, fenoxyetanol, alcohol feniletílico, nitrato fenilmercúrico, propilenglicol y/o timerosal. Los ejemplos de conservantes antimicóticos incluyen, entre otros, butilparabeno, metilparabeno, etilparabeno, 5 propilparabeno, ácido benzoico, ácido hidroxibenzoico, benzoato de potasio, sorbato de potasio, benzoato de sodio, propionato de sodio y/o ácido sóblico. Los ejemplos de conservantes de alcohol incluyen, pero no se limitan a, etanol, polietilenglicol, alcohol bencílico, fenol, compuestos fenólicos, bisfenol, clorobutanol, hidroxibenzoato y/o alcohol feniletílico. Los ejemplos de conservantes ácidos incluyen, pero no se limitan a, vitamina A, vitamina C, vitamina E, betacaroteno, ácido cítrico, ácido acético, ácido deshidroascórbico, ácido ascórbico, ácido sóblico y/o ácido fítico. Otros conservantes incluyen, pero no se limitan a, tocoferol, acetato de tocoferol, mesilato de deteroxima, cetrimida, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), etilendiamina, lauril sulfato de sodio (SLS), lauril éter sulfato de sodio (SLES), bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de potasio, metabisulfito de potasio, GLYDANT PLUS®, PHENONIP®, metilparabeno, 10 GERMALL® 115, GERMABEN®II, NEOLONE™, KATHON™ y/o EUXYL®.

Los agentes tamponadores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, soluciones tampón de citrato, soluciones tampón de acetato, soluciones tampón de fosfato, cloruro de amonio, carbonato de calcio, cloruro de calcio, citrato de calcio, glubionato de calcio, gluceptato de calcio, gluconato de calcio, ácido d-glucónico, 20 glicerofosfato de calcio, lactato de calcio, lactobionato de calcio, ácido propanoico, levulinato de calcio, ácido pentanoico, fosfato de calcio dibásico, ácido fosfórico, fosfato de calcio tribásico, fosfato de hidróxido de calcio, acetato de potasio, cloruro de potasio, gluconato de potasio, mezclas de potasio, fosfato de potasio dibásico, fosfato de potasio monobásico, mezclas de fosfato de potasio, acetato de sodio, bicarbonato de sodio, cloruro de sodio, citrato de sodio, lactato de sodio, fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio monobásico, mezclas de 25 fosfato de sodio, trometamina, tampones de aminosulfonato (*por ejemplo*, HEPES), hidróxido de magnesio, hidróxido de aluminio, ácido algínico, agua libre de pirógenos, solución salina isotónica, solución de Ringer, alcohol etílico y/o combinaciones de los mismos. Los agentes lubricantes pueden seleccionarse del grupo no limitante que consiste en estearato de magnesio, estearato de calcio, ácido esteárico, sílice, talco, malta, behenato de glicerilo, aceites vegetales hidrogenados, polietilenglicol, benzoato de sodio, acetato de sodio, 30 cloruro de sodio, leucina, lauril sulfato de magnesio, lauril sulfato de sodio y combinaciones de los mismos.

Los ejemplos de aceites incluyen, pero no se limitan a, almendra, semilla de albaricoque, aguacate, babasú, bergamota, semilla de grosella negra, borraja, cade, manzanilla, canola, alcaravea, carnauba, ricino, canela, manteca de cacao, coco, hígado de bacalao, café, maíz, semilla de algodón, emú, eucalipto, onagra, pescado, linaza, geraniol, calabaza, semilla de uva, avellana, hisopo, miristato de isopropilo, jojoba, nuez de kukui, lavandín, lavanda, limón, litsea cubeba, nuez de macadamia, malva, semilla de mango, semilla de espuma de pradera, visón, nuez moscada, oliva, naranja, reloj anaranjado, palma, palmiste, semilla de melocotón, maní, semilla de amapola, semilla de calabaza, colza, salvado de arroz, romero, cátamo, sándalo, sasquana, ajedrea, espino amarillo, sésamo, manteca de karité, silicona, aceites de soja, girasol, árbol del té, cardo, tsubaki, vetiver, nuez y germe de trigo, así como estearato de butilo, triglicérido caprílico, triglicérido cáprico, ciclometicona, sebacato de dietilo, dimeticona 360, simeticona, miristato de isopropilo, aceite mineral, octildodecanol, alcohol oleílico, aceite de silicona y/o combinaciones de los mismos.

Formulaciones

45 Las composiciones de nanopartículas pueden incluir un componente lipídico y uno o más componentes adicionales, tales como un agente terapéutico y/o profiláctico. Una composición de nanopartículas puede diseñarse para una o más aplicaciones u objetivos específicos. Los elementos de una composición de nanopartículas pueden seleccionarse en función de una aplicación o un objetivo particular, y/o en función de la eficacia, toxicidad, costo, facilidad de uso, disponibilidad u otra característica de uno o más elementos. De 50 manera similar, la formulación particular de una composición de nanopartículas puede seleccionarse para una aplicación o objetivo particular de acuerdo con, por ejemplo, la eficacia y toxicidad de combinaciones particulares de elementos.

55 El componente lipídico de una composición de nanopartículas puede incluir, por ejemplo, un lípido de acuerdo con la Fórmula (I), (IA), (IB), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe), (IIf) o (IIg), un fosfolípido (tal como un lípido insaturado, *por ejemplo*, DOPE o DSPC), un lípido PEG y un lípido estructural. Los elementos del componente lipídico pueden proporcionarse en restos específicos.

60 En algunos ejemplos, el componente lipídico de una composición de nanopartículas incluye un lípido de acuerdo con la Fórmula (I), (IA), (IB), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe), (IIf) o (IIg), un fosfolípido, un lípido PEG y un lípido estructural. En ciertos ejemplos, el componente lipídico de la composición de nanopartículas incluye aproximadamente entre un 30 % en moles y aproximadamente entre un 60 % en moles de compuesto de Fórmula (I), (IA), (IB), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe), (IIf) o (IIg), aproximadamente entre un 0 % en moles y 65 aproximadamente entre un 30 % en moles de fosfolípido, aproximadamente entre un 18.5 % en moles y aproximadamente entre un 48.5 % en moles de lípido estructural y aproximadamente entre un 0 % en moles y

aproximadamente entre un 10 % en moles de lípido PEG, siempre que el % en moles total no supere el 100 %. En algunos ejemplos, el componente lipídico de la composición de nanopartículas incluye aproximadamente entre un 35 % en moles y aproximadamente entre un 55 % en moles de compuesto de Fórmula (I), (IA), (IB), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IID), (IIe), (IIf) o (IIg), aproximadamente entre un 5 % en moles y aproximadamente entre un 40 % en moles de lípido estructural y aproximadamente entre un 0 % en moles y aproximadamente entre un 10 % en moles de lípido PEG. En un ejemplo particular, el componente lipídico incluye aproximadamente 50 % en moles de dicho compuesto, aproximadamente 10 % en moles de fosfolípido, aproximadamente 38.5 % en moles de lípido estructural y aproximadamente 1.5 % en moles de lípido PEG. En otro ejemplo particular, el componente lipídico incluye aproximadamente 40 % en moles de dicho compuesto, aproximadamente 20 % en moles de fosfolípido, aproximadamente 38.5 % en moles de lípido estructural y aproximadamente 1.5 % en moles de lípido PEG. En algunos ejemplos, el componente lipídico de la composición de nanopartículas incluye aproximadamente entre un 45 % en moles y aproximadamente entre un 65 % en moles de compuesto de Fórmula (I), (IA), (IB), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IID), (IIe), (IIf) o (IIg), aproximadamente entre un 5 % en moles y aproximadamente entre un 10 % en moles de fosfolípido, aproximadamente entre un 25 % en moles y aproximadamente entre un 35 % en moles de lípido estructural y aproximadamente entre un 5 % en moles y aproximadamente entre un 10 % en moles de lípido PEG, siempre que el % en moles total no exceda el 100 %. En algunos ejemplos, el fosfolípido puede ser DOPE o DSPC. En otros ejemplos, el lípido PEG puede ser PEG-DMG y/o el lípido estructural puede ser colesterol.

En algunos ejemplos, el componente lipídico de una composición de nanopartículas incluye un lípido catiónico, un fosfolípido, un surfactante y un derivado de colesterol. En ciertos ejemplos, el componente lipídico de la composición de nanopartículas incluye aproximadamente entre un 30 % en moles y aproximadamente entre un 60 % en moles de lípido catiónico, aproximadamente entre un 0 % en moles y aproximadamente entre un 30 % en moles de fosfolípido, aproximadamente entre un 18.5 % en moles y aproximadamente entre un 48.5 % en moles de surfactante y aproximadamente entre un 0 % en moles y aproximadamente entre un 10 % en moles de derivado de colesterol, siempre que el % en moles total no exceda el 100 %. En algunos ejemplos, el componente lipídico de la composición de nanopartículas incluye aproximadamente entre un 45 % en moles y aproximadamente entre un 65 % en moles de lípido catiónico, aproximadamente entre un 5 % en moles y aproximadamente entre un 10 % en moles de fosfolípido, aproximadamente entre un 25 % en moles y aproximadamente entre un 35 % en moles de derivado de colesterol y aproximadamente entre un 5 % en moles y aproximadamente entre un 10 % en moles de surfactante, siempre que el % en moles total no exceda el 100 %.

Las composiciones de nanopartículas pueden diseñarse para una o más aplicaciones u objetivos específicos. Por ejemplo, una composición de nanopartículas puede diseñarse para administrar un agente terapéutico y/o profiláctico, tal como un ARN, a una célula, tejido, órgano o sistema particular o grupo de ellos en el cuerpo de un mamífero. Las propiedades fisicoquímicas de las composiciones de nanopartículas pueden alterarse para aumentar la selectividad para objetivos corporales específicos. Por ejemplo, los tamaños de las partículas pueden ajustarse en función del tamaño de las fenestraciones de los diferentes órganos. El agente terapéutico y/o profiláctico incluido en una composición de nanopartículas también puede seleccionarse en función del objetivo o los objetivos de administración deseados. Por ejemplo, se puede seleccionar un agente terapéutico y/o profiláctico para una indicación, condición, enfermedad o trastorno particular y/o para su administración a una célula, tejido, órgano o sistema particular o grupo de ellos (*por ejemplo*, administración localizada o específica). En ciertas realizaciones, una composición de nanopartículas puede incluir un ARNm que codifica un polipéptido de interés capaz de traducirse dentro de una célula para producir el polipéptido de interés. Dicha composición puede estar diseñada para ser administrada específicamente a un órgano particular. En algunas realizaciones, una composición puede estar diseñada para ser administrada específicamente a un hígado de mamífero.

La cantidad de un agente terapéutico y/o profiláctico en una composición de nanopartículas puede depender del tamaño, la composición, el objetivo deseado y/o la aplicación, u otras propiedades de la composición de nanopartículas, así como de las propiedades del agente terapéutico y/o profiláctico. Por ejemplo, la cantidad de ARN útil en una composición de nanopartículas puede depender del tamaño, la secuencia y otras características del ARN. Las cantidades relativas de un elemento terapéutico y/o profiláctico y otros elementos (por ejemplo, lípidos) en una composición de nanopartículas también pueden variar. En algunas realizaciones, la relación peso/peso del componente lipídico con respecto a un agente terapéutico y/o profiláctico en una composición de nanopartículas puede ser de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 60:1, como por ejemplo 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1 y 60:1. Por ejemplo, la relación peso/peso del componente lipídico con respecto a un agente terapéutico y/o profiláctico puede ser de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 40:1. En ciertas realizaciones, la relación peso/peso es de aproximadamente 20:1. La cantidad de un agente terapéutico y/o profiláctico en una composición de nanopartículas puede, por ejemplo, medirse utilizando espectroscopía de absorción (*por ejemplo*, espectroscopía ultravioleta-visible).

En algunas realizaciones, una composición de nanopartículas incluye uno o más ARN, y los uno o más ARN,

lípidos y cantidades de los mismos pueden seleccionarse para proporcionar una relación N:P específica. La relación N:P de la composición se refiere a la relación molar de átomos de nitrógeno en uno o más lípidos con respecto al número de grupos fosfato en un ARN. En general, se prefiere una relación N:P más baja. El uno o más ARN, lípidos y cantidades de los mismos pueden seleccionarse para proporcionar una relación N:P de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 30:1, como por ejemplo 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 12:1, 14:1, 16:1, 18:1, 20:1, 22:1, 24:1, 26:1, 28:1 o 30:1. En ciertas realizaciones, la relación N:P puede ser de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 8:1. En otras realizaciones, la relación N:P es de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 8:1. Por ejemplo, la relación N:P puede ser de aproximadamente 5.0:1, aproximadamente 5.5:1, aproximadamente 5.67:1, aproximadamente 6.0:1, aproximadamente 6.5:1, o 10) aproximadamente 7.0:1. Por ejemplo, la relación N:P puede ser de aproximadamente 5.67:1.

Propiedades físicas

Las características de una composición de nanopartículas pueden depender de sus componentes. Por ejemplo, una composición de nanopartículas que incluye colesterol como lípido estructural puede tener características diferentes a las de una composición de nanopartículas que incluye un lípido estructural diferente. De manera similar, las características de una composición de nanopartículas pueden depender de las cantidades absolutas o relativas de sus componentes. Por ejemplo, una composición de nanopartículas que incluya una fracción molar más alta de un fosfolípido puede tener características diferentes que una composición de nanopartículas que incluya un resto molar más baja de un fosfolípido. Las características también pueden variar dependiendo del método y las condiciones de preparación de la composición de nanopartículas.

Las composiciones de nanopartículas se pueden caracterizar por una variedad de métodos. Por ejemplo, puede usarse microscopía (p.ej., microscopía electrónica de transmisión o microscopía electrónica de barrido) para examinar la morfología y distribución de tamaño de una composición de nanopartículas. La dispersión dinámica de la luz o la potenciómetría (por ejemplo, titulaciones potenciométricas) pueden usarse para medir los potenciales zeta. La dispersión dinámica de la luz también se puede utilizar para determinar el tamaño de las partículas. También se pueden utilizar instrumentos tales como el Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, Reino Unido) para medir múltiples características de una composición de nanopartículas, tales como el tamaño de las partículas, el índice de polidispersidad y el potencial zeta.

El tamaño medio de una composición de nanopartículas puede estar entre decenas de nm y centenas de nm, por ejemplo, medido por dispersión de luz dinámica (DLS). Por ejemplo, el tamaño medio puede ser de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 150 nm, tal como aproximadamente 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 105 nm, 110 nm, 115 nm, 120 nm, 125 nm, 130 nm, 135 nm, 140 nm, 145 nm o 150 nm. En algunas realizaciones, el tamaño medio de una composición de nanopartículas puede ser de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 80 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 70 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 60 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 80 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 70 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 130 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 80 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 130 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 100 nm. En ciertas realizaciones, el tamaño medio de una composición de nanopartículas puede ser de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 130 nm o de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 100 nm. En una realización particular, el tamaño medio puede ser de aproximadamente 80 nm. En otras realizaciones, el tamaño medio puede ser de aproximadamente 100 nm. En otras realizaciones, el tamaño medio puede ser de unos 120 nm.

Una composición de nanopartículas puede ser relativamente homogénea. Un índice de polidispersidad puede utilizarse para indicar la homogeneidad de una composición de nanopartículas, *por ejemplo*, la distribución del tamaño de las partículas de las composiciones de nanopartículas. Un índice de polidispersidad pequeño (por ejemplo, inferior a 0.3) generalmente indica una distribución de tamaño de partículas estrecha. Una composición de nanopartículas puede tener un índice de polidispersidad de aproximadamente 0 a aproximadamente 0.25, tal como 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.10, 0.11, 0.12, 0.13, 0.14, 0.15, 0.16, 0.17, 0.18, 0.19, 0.20, 0.21, 0.22, 0.23, 0.24 o 0.25. En algunas realizaciones, el índice de polidispersidad de una composición de nanopartículas puede ser de aproximadamente 0.10 a aproximadamente 0.20.

El potencial zeta de una composición de nanopartículas puede usarse para indicar el potencial electrocinético de la composición. Por ejemplo, el potencial zeta puede describir la carga superficial de una composición de nanopartículas. Las composiciones de nanopartículas con cargas relativamente bajas, positivas o negativas

son generalmente deseables, ya que las especies más altamente cargadas pueden interactuar de forma indeseable con células, tejidos y otros elementos del cuerpo. En algunas realizaciones, el potencial zeta de una composición de nanopartículas puede ser de aproximadamente -10 mV a aproximadamente +20 mV, de

- 5 aproximadamente -10 mV a aproximadamente +15 mV, de aproximadamente -10 mV a aproximadamente +10 mV, de aproximadamente -10 mV a aproximadamente +5 mV, de aproximadamente -10 mV a aproximadamente 0 mV, de aproximadamente -10 mV a aproximadamente -5 mV, de aproximadamente -5 mV a aproximadamente +20 mV, de aproximadamente -5 mV a aproximadamente +15 mV, de aproximadamente -5 mV a aproximadamente +10 mV, de aproximadamente -5 mV a aproximadamente +5 mV, de aproximadamente -5 mV a aproximadamente 0 mV, de aproximadamente 0 mV a aproximadamente +20 mV, de aproximadamente 0 mV a aproximadamente +15 mV, de aproximadamente 0 mV a aproximadamente +10 mV, de
- 10 aproximadamente 0 mV a aproximadamente +5 mV, de aproximadamente +5 mV a aproximadamente +20 mV, de aproximadamente +5 mV a aproximadamente +15 mV, o de aproximadamente +5 mV a aproximadamente +10 mV.

- 15 La eficiencia de la encapsulación de un terapéutico y/o profiláctico describe la cantidad de terapéutico y/o profiláctico que se encapsula o se asocia de otro modo con una composición de nanopartículas después de la preparación, en relación con la cantidad inicial proporcionada. La eficacia de encapsulación es deseablemente alta (*por ejemplo*, cercana al 100 %). La eficacia de la encapsulación puede medirse, por ejemplo, comparando la cantidad de terapéutico y/o profiláctico en una solución que contiene la composición de nanopartículas antes y después de romper la composición de nanopartículas con uno o más disolventes orgánicos o detergentes. La fluorescencia puede utilizarse para medir la cantidad de terapéutico y/o profiláctico libre (*por ejemplo*, ARN) en una solución. Para las composiciones de nanopartículas aquí descritas, la eficacia de encapsulación de un terapéutico y/o profiláctico puede ser de al menos 50 %, por ejemplo 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %. En algunas realizaciones, 20 la eficacia de encapsulación puede ser de al menos el 80 %. En ciertas realizaciones, la eficacia de encapsulación puede ser de al menos el 90 %.
- 25

- 30 Una composición de nanopartículas puede comprender opcionalmente uno o más recubrimientos. Por ejemplo, una composición de nanopartículas puede formularse en una cápsula, película o comprimido que tenga un recubrimiento. Una cápsula, película o tableta que incluye una composición descrita en el presente documento puede tener cualquier tamaño, resistencia a la tracción, dureza o densidad útiles.

Composiciones farmacéuticas

- 35 Las composiciones de nanopartículas pueden formularse total o parcialmente como composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir una o más composiciones de nanopartículas. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede incluir una o más composiciones de nanopartículas que incluyen uno o más agentes terapéuticos y/o profilácticos diferentes. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir además uno o más excipientes o principios accesorios farmacéuticamente aceptables como los que se describen en el presente documento. Las directrices generales para la formulación y fabricación de composiciones y agentes farmacéuticos están disponibles, por ejemplo, en Remington's The Science y Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro; Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006. Se pueden utilizar excipientes y principios accesorios convencionales en cualquier composición farmacéutica, excepto en la medida en que cualquier excipiente o principio accesorio convencional pueda ser incompatible con uno o más componentes de una composición de nanopartículas. Un excipiente o principio accesorio puede ser incompatible con un componente de una composición de nanopartículas si su combinación con el componente puede dar como resultado algún efecto biológico indeseable o algún otro efecto perjudicial.
- 40
- 45

- 50 En algunas realizaciones, uno o más excipientes o ingredientes accesorios pueden constituir más del 50 % de la masa o volumen total de una composición farmacéutica que incluya una composición de nanopartículas. Por ejemplo, uno o más excipientes o ingredientes accesorios pueden constituir el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más de una convención farmacéutica. En algunas realizaciones, un excipiente farmacéuticamente aceptable es al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % puro. En algunas realizaciones, un excipiente se aprueba para su uso en animales o para uso veterinario. En algunas realizaciones, un excipiente es aprobado por la administración de alimentos y medicamentos de los EE. UU. En algunas realizaciones, un excipiente tiene un grado farmacéutico. En algunas realizaciones, un excipiente cumple con los estándares de la Farmacopea de los EE. UU. (USP), la Farmacopea europea (EP), la Farmacopea británica y/o la Farmacopea internacional.

- 55
- 60 Las cantidades relativas de la una o más composiciones de nanopartículas, el uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, y/o cualquier ingrediente adicional en una composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación variarán, dependiendo de la identidad, tamaño, y/o condición del sujeto tratado y además dependiendo de la vía por la cual la composición se va a administrar. A modo de ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender entre 0.1 % y 100 % (peso/peso) de una o más composiciones de nanopartículas.
- 65

En ciertas realizaciones, las composiciones de nanopartículas y/o composiciones farmacéuticas de la divulgación se refrigeran o congelan para su almacenamiento y/o envío (por ejemplo, almacenándose a una temperatura de 4 °C o inferior, tal como una temperatura entre aproximadamente -150 °C y aproximadamente 0 °C o entre aproximadamente -80 °C y aproximadamente -20 °C (por ejemplo, aproximadamente -5 °C, -10 °C, -15 °C, -20 °C, -25 °C, -30 °C, -40 °C, -50 °C, -60 °C, -70 °C, -80 °C, -90 °C, -130 °C o -150 °C). Por ejemplo, la composición farmacéutica que comprende un compuesto de cualquiera de las Fórmulas (I), (IA), (II) y (IIa)-(IIe) es una solución que se refriega para su almacenamiento y/o envío a, por ejemplo, aproximadamente -20 °C, -30 °C, -40 °C, -50 °C, -60 °C, -70 °C u -80 °C. En ciertos ejemplos, la divulgación también se refiere a un método para aumentar la estabilidad de las composiciones de nanopartículas y/o composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de cualquiera de las Fórmulas (I), (IA), (II) y (IIa)-(IIe) almacenando las composiciones de nanopartículas y/o composiciones farmacéuticas a una temperatura de 4 °C o inferior, tal como una temperatura entre aproximadamente -150 °C y aproximadamente 0 °C o entre aproximadamente -80 °C y aproximadamente -20 °C, por ejemplo, aproximadamente -5 °C, -10 °C, -15 °C, -20 °C, -25 °C, -30 °C, -40 °C, -50 °C, -60 °C, -70 °C, -80 °C, -90 °C, -130 °C o -150 °C). Por ejemplo, las composiciones de nanopartículas y/o composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento son estables durante aproximadamente al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 5 semanas, al menos 6 semanas, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 4 meses, al menos 6 meses, al menos 8 meses, al menos 10 meses, al menos 12 meses, al menos 14 meses, al menos 16 meses, al menos 18 meses, al menos 20 meses, al menos 22 meses o al menos 24 meses, por ejemplo, a una temperatura de 4 °C o inferior (por ejemplo, entre aproximadamente 4 °C y -20 °C). En una realización, la formulación se estabiliza durante al menos 4 semanas a aproximadamente 4 °C. En ciertos ejemplos, la composición farmacéutica de la divulgación comprende una composición de nanopartículas divulgada en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable seleccionado entre uno o más de Tris, un acetato (por ejemplo, acetato de sodio), un citrato (por ejemplo, citrato de sodio), solución salina, PBS y sacarosa. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la divulgación tiene un valor de pH entre aproximadamente 7 y 8 (por ejemplo, 6.8 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9 u 8.0, o entre 7.5 y 8 o entre 7 y 7.8). Por ejemplo, una composición farmacéutica de la divulgación comprende una composición de nanopartículas divulgada en el presente documento, Tris, solución salina y sacarosa, y tiene un pH de aproximadamente 7.5-8, que es adecuado para el almacenamiento y/o envío a, por ejemplo, aproximadamente -20 °C. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la divulgación comprende una composición de nanopartículas divulgada en el presente documento y PBS y tiene un pH de aproximadamente 7-7.8, adecuado para el almacenamiento y/o envío a, por ejemplo, aproximadamente 4 °C o menos. "Estabilidad", "estabilizado" y "estable" en el contexto de la presente divulgación se refieren a la resistencia de las composiciones de nanopartículas y/o composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento a cambios químicos o físicos (por ejemplo, degradación, cambio de tamaño de partícula, agregación, cambio en la encapsulación, etc.) en determinadas condiciones de fabricación, preparación, transporte, almacenamiento y/o uso, por ejemplo, cuando se aplica tensión como fuerza de cizallamiento, tensión de congelación/descongelación, etc.

- Las composiciones de nanopartículas y/o composiciones farmacéuticas que incluyen una o más composiciones de nanopartículas se pueden administrar a cualquier paciente o sujeto, incluidos aquellos pacientes o sujetos que pueden beneficiarse de un efecto terapéutico proporcionado por la administración de un agente terapéutico y/o profiláctico a una o más células, tejidos, órganos o sistemas particulares o grupos de los mismos, como el sistema renal. Aunque las descripciones que aquí se ofrecen de composiciones de nanopartículas y composiciones farmacéuticas que incluyen composiciones de nanopartículas se dirigen principalmente a composiciones que son adecuadas para la administración a seres humanos, el experto entenderá que dichas composiciones son generalmente adecuadas para la administración a cualquier otro mamífero. La modificación de composiciones adecuadas para la administración a seres humanos con el fin de hacer que las composiciones sean adecuadas para la administración a diversos animales está bien entendida, y el farmacólogo veterinario normalmente experto puede diseñar y/o realizar dicha modificación con una experimentación meramente ordinaria, si la hubiera. Los sujetos a los que se contempla la administración de las composiciones incluyen, pero no se limitan a, humanos, otros primates y otros mamíferos, incluyendo mamíferos comercialmente relevantes como vacas, cerdos, mangúeras, ovejas, gatos, perros, ratones y/o ratas.
- Una composición farmacéutica que incluya una o más composiciones de nanopartículas puede prepararse mediante cualquier método conocido o desarrollado en lo sucesivo en el arte de la farmacología. En general, dichos métodos preparatorios incluyen la asociación del principio activo con un excipiente y/o uno o más ingredientes accesorios y, a continuación, si es deseable o necesario, la división, conformación y/o envasado del producto en una unidad de dosis única o múltiple deseada.
- Una composición farmacéutica según la presente descripción puede prepararse, empaquetarse y/o venderse a granel, como una dosis unitaria individual y/o como una pluralidad dosis unitarias individuales. Tal como se utiliza en el presente documento, una «dosis unitaria» es una cantidad discreta de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del principio activo (por ejemplo, la composición de nanopartículas). La cantidad del principio activo es generalmente igual a la dosificación del principio activo que se administraría a un sujeto y/o una fracción conveniente de dicha dosificación tal como, por ejemplo, la mitad

o un tercio de dicha dosificación.

Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse en una variedad de formas adecuadas para una variedad de vías y métodos de administración. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden prepararse en formas de dosificación líquidas (*por ejemplo*, emulsiones, microemulsiones, nanoemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires), formas inyectables, formas de dosificación sólidas (*por ejemplo*, cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos), formas de dosificación para administración tópica y/o transdérmica (*por ejemplo*, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, aerosoles, inhalantes y parches), suspensiones, polvos y otras formas.

Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral y parenteral incluyen, pero no se limitan a, emulsiones, microemulsiones, nanoemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y/o elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los principios activos, las formas de dosificación líquidas pueden comprender diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros

disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales pueden incluir terapéuticos

y/o profilácticos adicionales, agentes adicionales como humectantes, emulsionantes y agentes de suspensión, edulcorantes, saborizantes y/o agentes perfumantes. En determinadas realizaciones, para administración parenteral, las composiciones se mezclan con agentes solubilizantes tales como Cremophor®, alcoholes, aceites, aceites modificados, glicoles, polisorbatos, ciclodextrinas, polímeros, y/o combinaciones de los mismos.

Se pueden formular las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, según la técnica conocida utilizando agentes dispersantes, agentes humectantes y/o agentes de suspensión adecuados. Las preparaciones inyectables estériles pueden ser soluciones, suspensiones y/o emulsiones inyectables estériles en diluyentes y/o disolventes parenteralmente aceptables no tóxicos, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los solventes y vehículos aceptables que pueden ser empleados se encuentran agua, solución de Ringer, U.S.P. y solución isotónica de cloruro de sodio. Se emplean convencionalmente aceites fijos estériles como un disolvente o medio de suspensión. A tales efectos, se puede emplear cualquier aceite no volátil insípido, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos tales como el ácido oleico se pueden usar en la preparación de inyectables.

Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias, y/o mediante la incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que se puedan disolver o dispersar en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.

Para prolongar el efecto de un principio activo, a menudo es deseable retardar la absorción del principio activo por inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede lograr mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfó con una escasa solubilidad en agua. Entonces, la velocidad de absorción del fármaco depende de su velocidad de disolución, la que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y de la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma de fármaco administrada por vía parenteral se logra disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo de aceite. Las formas de depósito inyectables se fabrican formando matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables como la polilactida-poliglicolida. En función de la relación del fármaco respecto al polímero y de la naturaleza del polímero particular utilizado se puede controlar la velocidad de liberación del fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones de depósito inyectables se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales.

Las composiciones para la administración rectal o vaginal son típicamente supositorios que pueden prepararse mezclando las composiciones con excipientes no irritantes adecuados, tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de suppositorio, los cuales son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a temperatura corporal y, por lo tanto, se derriten en el recto o cavidad vaginal y liberan el principio activo.

Las formas farmacéuticas sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, películas, polvos y gránulos. En dichas formas de dosificación sólidas, un principio activo se mezcla con al menos un excipiente inerte farmacéuticamente aceptable, tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o cargas o diluyentes (*por ejemplo*, almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico), aglutinantes (*por ejemplo*, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidinona, sacarosa y acacia), humectantes (*por ejemplo*, glicerol), agentes desintegrantes (*por ejemplo*, agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos y carbonato de sodio), agentes retardantes de la solución (*por ejemplo*, parafina), aceleradores de absorción (*por ejemplo*, compuestos de amonio cuaternario), agentes

humectantes (*por ejemplo*, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol), absorbentes (*por ejemplo*, caolín y arcilla de bentonita) y lubricantes (*por ejemplo*, talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio), y mezclas de los mismos. En el caso de las cápsulas, comprimidos y pastillas, las formas de dosificación pueden comprender agentes tamponadores.

- 5 Las composiciones sólidas de un tipo similar se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina rellenas duras y blandas usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y cubiertas tales como recubrimientos entéricos y otros 10 recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Opcionalmente pueden comprender agentes opacificantes y pueden ser de una composición que liberen el principio o principios activos solo, o preferentemente, en una determinada parte del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras. Las 15 composiciones sólidas de un tipo similar se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina rellenas duras y blandas usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Las formas de dosificación para la administración tópica y/o transdérmica de una composición pueden incluir pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, aerosoles, inhalantes y/o parches.

- 20 Generalmente, un principio activo se mezcla en condiciones estériles con un excipiente farmacéuticamente aceptable y/o cualquier conservante y/o tampón necesario, según sea necesario. Además, la presente descripción contempla el uso de parches transdérmicos, que a menudo tienen la ventaja adicional de proporcionar una administración controlada de un compuesto al cuerpo. Dichas formas de dosificación pueden 25 prepararse, por ejemplo, disolviendo y/o dispersando el compuesto en el medio apropiado. Como alternativa o adicionalmente, la velocidad se puede controlar ya sea proporcionando una membrana de control de velocidad y/o mediante la dispersión del compuesto en un gel y/o una matriz polimérica.

Los dispositivos adecuados para administrar las composiciones farmacéuticas intradérmicas descritas en el presente documento incluyen dispositivos de aguja corta como los descritos en los documentos de Patentes

- 30 de EE. UU. 4,886,499; 5,190,521; 5,328,483; 5,527,288; 4,270,537; 5,015,235; 5,141,496; y 5,417,662. Composiciones intradérmicas se pueden administrar mediante dispositivos que limitan la extensión de penetración efectiva de una aguja en la piel, tales como los que se describen en la Publicación PCT WO 99/34850 y equivalentes funcionales de los mismos. Son adecuados los dispositivos de inyección a chorro que suministran composiciones líquidas a la dermis a través de un inyector de chorro de líquido y/o a través de una 35 aguja que perfora el estrato córneo y produce un chorro que llega a la dermis. Los dispositivos de inyección a chorro se describen, por ejemplo, en las Patentes EE. UU. 5,480,381; 5,599,302; 5,334,144; 5,993,412; 5,649,912; 5,569,189; 5,704,911; 5,383,851; 5,893,397; 5,466,220; 5,339,163; 5,312,335; 5,503,627; 5,064,413; 5,520,639; 4,596,556; 4,790,824; 4,941,880; 4,940,460; y Publicaciones PCT WO 97/37705 y WO 40 97/13537. Son adecuados los dispositivos balísticos de administración de polvo/partículas que utilizan gas comprimido para acelerar la vacuna en forma de polvo a través de las capas externas de la piel hasta la dermis. Como alternativa o adicionalmente, se pueden usar jeringas convencionales en el procedimiento clásico de administración intradérmica de mantoux.

Las formulaciones adecuadas para la administración tópica incluyen, pero no se limitan a, preparaciones

- 45 líquidas y/o semilíquidas tales como linimentos, lociones, emulsiones de aceite en agua y/o de agua en aceite tales como cremas, ungüentos y/o pastas y/o soluciones y/o suspensiones. Las formulaciones de administración tópica pueden, por ejemplo, comprender desde aproximadamente 1 % hasta aproximadamente 10 % (peso/peso) de ingrediente activo, aunque la concentración de ingrediente activo puede ser tan alta como el límite de solubilidad del ingrediente activo en el disolvente. Las formulaciones para administración tópica 50 pueden comprender además uno o más de los principios adicionales descritos en esta invención.

Se puede preparar, empaquetar y/o vender una composición farmacéutica en una formulación adecuada para administración pulmonar a través de la cavidad bucal. Dicha formulación puede comprender partículas secas que contengan el principio activo. Dichas composiciones se presentan convenientemente en forma de polvos

- 55 secos para su administración mediante un dispositivo que comprende un depósito de polvo seco al que puede dirigirse una corriente de propelente para dispersar el polvo y/o mediante un recipiente dispensador de disolvente/polvo autopropulsado, como un dispositivo que comprende el principio activo disuelto y/o suspendido en un propelente de bajo punto de ebullición en un recipiente sellado. Las composiciones de polvo seco pueden incluir un diluyente de polvo fino sólido tal como azúcar y se proporcionan convenientemente en forma de dosis unitaria.

Los propulsores de bajo punto de ebullición generalmente incluyen propulsores líquidos que tienen un punto de ebullición inferior a 65 °F a presión atmosférica. Generalmente, el propulsor puede constituir del 50 % al 99.9 % (peso/peso) de la composición, y el ingrediente activo puede constituir del 0.1 % al 20 % (peso/peso)

- 65 de la composición. Un propulsor puede comprender además principios adicionales tales como un tensioactivo líquido no iónico y/o aniónico sólido y/o un diluyente sólido (que puede tener un tamaño de partícula del mismo

orden que las partículas que comprenden el principio activo).

Las composiciones farmacéuticas formuladas para administración pulmonar pueden proporcionar un principio activo en forma de gotitas de una solución y/o suspensión. Dichas formulaciones pueden prepararse, empaquetarse y/o venderse como soluciones y/o suspensiones acuosas y/o alcohólicas diluidas,

- 5 opcionalmente estériles, que comprenden principio activo, y pueden administrarse convenientemente usando cualquier dispositivo de nebulización y/o atomización. Dichas formulaciones pueden comprender además uno o más principios adicionales que incluyen, pero no se limitan a, un agente aromatizante como sacarina sódica, un aceite volátil, un agente tamponador, un agente tensioactivo y/o un conservante como metilhidroxibenzoato.
- 10 Las gotas suministradas por esta vía de administración pueden tener un diámetro medio comprendido entre 1 nm y 200 nm aproximadamente.

Las formulaciones descritas en esta invención como útiles para la administración pulmonar son útiles para la administración intranasal de una composición farmacéutica. Otra formulación adecuada para la administración

- 15 intranasal es un polvo grueso que comprende el principio activo y que tiene una partícula promedio de alrededor de 0.2 µm a 500 µm. Dicha formulación se administra de la manera en que se toma el rapé, es decir, mediante inhalación rápida a través de las fosas nasales desde un recipiente del polvo que se mantiene cerca de la nariz.

Las formulaciones adecuadas para la administración nasal pueden, por ejemplo, comprender desde

- 20 aproximadamente tan poco como 0.1 % (peso/peso) y tanto como 100 % (peso/peso) de ingrediente activo, y pueden comprender uno o más de los ingredientes adicionales descritos en el presente documento. Se puede preparar, empaquetar y/o vender una composición farmacéutica en una formulación adecuada para administración bucal. Dichas formulaciones pueden, por ejemplo, presentarse en forma de comprimidos y/o

- 25 pastillas elaboradas mediante métodos convencionales, y pueden, por ejemplo, contener entre un 0.1 % y un 20 % (peso/peso) de ingrediente activo, comprendiendo el resto una composición soluble y/o degradable por vía oral y, opcionalmente, uno o más de los ingredientes adicionales descritos en el presente documento. Alternativamente, las formulaciones adecuadas para la administración bucal pueden comprender un polvo y/o una solución y/o suspensión aerosolizada y/o atomizada que comprende un principio activo. Dichas formulaciones en polvo, aerosolizadas y/o en aerosol, cuando se dispersan, pueden tener un tamaño promedio

- 30 de partículas y/o gotas en el intervalo de alrededor de 0.1 nm a alrededor de 200 nm, y pueden comprender además uno o más de cualquiera de los principios adicionales descritos en esta invención.

Se puede preparar, empaquetar y/o vender una composición farmacéutica en una formulación adecuada para administración oftálmica. Tales formulaciones pueden, por ejemplo, presentarse en forma de gotas oftálmicas

- 35 que incluyan, por ejemplo, una solución y/o suspensión al 0.1/1.0 % (peso/peso) del principio activo en un excipiente líquido acuoso u oleoso. Dichas gotas pueden comprender además agentes tamponadores, sales y/o uno o más de cualquiera de los principios adicionales descrito en esta invención. Otras formulaciones de administración oftálmica que son útiles incluyen aquellas que comprenden el principio activo en forma microcristalina y/o en una preparación liposomal. Se contempla que las gotas para los oídos y/o las gotas

- 40 oftálmicas quedan comprendidas en el alcance de la presente descripción.

Métodos de producción de polipéptidos en células

La presente divulgación proporciona métodos para producir un polipéptido de interés en una célula de

- 45 mamífero. Los métodos para producir polipéptidos implican poner en contacto una célula con una composición de nanopartículas que incluye un ARNm que codifica el polipéptido de interés. Al entrar en contacto la célula con la composición de nanopartículas, el ARNm puede ser absorbido y traducido en la célula para producir el polipéptido de interés.

- 50 En general, la etapa de poner en contacto una célula de mamífero con una composición de nanopartículas que incluye un ARNm que codifica un polipéptido de interés se puede realizar *in vivo*, *ex vivo*, en cultivo o *in vitro*. La cantidad de composición de nanopartículas en contacto con una célula, y/o la cantidad de ARNm en la misma, puede depender del tipo de célula o tejido que se contacta, el medio de administración, las características fisicoquímicas de la composición de nanopartículas y el ARNm (*por ejemplo*, tamaño, carga y composición química) en la misma, y otros factores. En general, una cantidad eficaz de la composición de nanopartículas permitirá la producción eficiente de polipéptidos en la célula. Las medidas para la eficacia pueden incluir la traducción de polipéptidos (indicada por la expresión de polipéptidos), el nivel de degradación del ARNm y los indicadores de respuesta inmunitaria.

- 60 La etapa de poner en contacto una composición de nanopartículas que incluye un ARNm con una célula puede implicar o causar transfección. Un fosfolípido incluido en el componente lipídico de una composición de nanopartículas puede facilitar la transfección y/o aumentar la eficiencia de la transfección, por ejemplo, interactuando y/o fusionándose con una membrana celular o intracelular. La transfección puede permitir la traducción del ARNm dentro de la célula.

- 65 En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas de la invención descritas en el presente

documento pueden usarse terapéuticamente. Por ejemplo, un ARNm incluido en una composición de nanopartículas puede codificar un polipéptido terapéutico (*por ejemplo*, en una región traducible) y producir el polipéptido terapéutico al entrar en contacto y/o entrar (*por ejemplo*, transfección) en una célula. En otras realizaciones, un ARNm incluido en una composición de nanopartículas puede codificar un polipéptido que 5 puede mejorar o aumentar la inmunidad de un sujeto. Por ejemplo, un ARNm puede codificar un factor estimulante de colonias de granulocitos o trastuzumab.

En ciertas realizaciones, un ARNm incluido en una composición de nanopartículas puede codificar un polipéptido recombinante que puede reemplazar uno o más polipéptidos que pueden estar sustancialmente ausentes en una célula en contacto con la composición de nanopartículas. El uno o más polipéptidos sustancialmente ausentes pueden faltar debido a una mutación genética del gen codificante o una vía reguladora del mismo. Alternativamente, un polipéptido recombinante producido por traducción del ARNm puede antagonizar la actividad de una proteína endógena presente en la célula, en su superficie o secretada por ella. Puede ser deseable un polipéptido recombinante antagonista para combatir los efectos nocivos 10 causados por las actividades de la proteína endógena, tales como actividades alteradas o localización causadas por mutación. En otra alternativa, un polipéptido recombinante producido por traducción del ARNm puede antagonizar indirecta o directamente la actividad de una fracción biológica presente en la célula, en su superficie o secretada por ella. Los restos biológicos antagonizados pueden incluir, entre otras, lípidos (*por ejemplo*, colesterol), lipoproteínas (*por ejemplo*, lipoproteína de baja densidad), ácidos nucleicos, 15 carbohidratos y toxinas de moléculas pequeñas. Los polipéptidos recombinantes producidos por la traducción del ARNm pueden diseñarse para su localización dentro de la célula, como dentro de un compartimento específico como el núcleo, o pueden diseñarse para su secreción desde la célula o para su translocación a la membrana plasmática de la célula.

20 En algunas realizaciones, poner en contacto una célula con una composición de nanopartículas que incluye un ARNm puede reducir la respuesta inmune innata de una célula a un ácido nucleico exógeno. Una célula puede ponerse en contacto con una primera composición de nanopartículas que incluye una primera cantidad de un primer ARNm exógeno que incluye una región traducible y se puede determinar el nivel de la respuesta inmune innata de la célula al primer ARNm exógeno. Posteriormente, la célula puede ponerse en contacto con una 25 segunda composición que incluye una segunda cantidad del primer ARNm exógeno, siendo la segunda cantidad una cantidad menor del primer ARNm exógeno en comparación con la primera cantidad. Alternativamente, la segunda composición puede incluir una primera cantidad de un segundo ARNm exógeno que es diferente del primer ARNm exógeno. Las etapas de poner en contacto la célula con la primera y segunda 30 composiciones pueden repetirse una o más veces. Adicionalmente, se puede determinar opcionalmente la eficiencia de la producción de polipéptidos (*por ejemplo*, traducción) en la célula, y la célula puede volver a 35 ponerse en contacto con la primera y/o segunda composición repetidamente hasta que se logre una eficiencia de producción de proteína diana.

Métodos de administración de agentes terapéuticos a células y órganos

40 La presente divulgación proporciona métodos para administrar un agente terapéutico y/o profiláctico a una célula u órgano de un mamífero. La administración de un agente terapéutico y/o profiláctico a una célula implica administrar una composición de nanopartículas que incluye el agente terapéutico y/o profiláctico a un sujeto, donde la administración de la composición implica poner en contacto la célula con la composición. Por ejemplo, 45 una proteína, un agente citotóxico, un ion radiactivo, un agente quimioterapéutico o un ácido nucleico (tal como un ARN, *por ejemplo*, ARNm) se puede administrar a una célula u órgano. En el caso de que un agente terapéutico y/o profiláctico sea un ARNm, al entrar en contacto una célula con la composición de nanopartículas, un ARNm traducible puede traducirse en la célula para producir un polipéptido de interés. Sin embargo, también pueden administrarse a las células ARNm que no son sustancialmente traducibles. Los 50 ARNm sustancialmente no traducibles pueden ser útiles como vacunas y/o pueden secuestrar componentes de la traducción de una célula para reducir la expresión de otras especies en la célula.

55 En algunas realizaciones, una composición de nanopartículas puede apuntar a un tipo o clase particular de células (*por ejemplo*, células de un órgano o sistema particular del mismo). Por ejemplo, una composición de nanopartículas que incluye un agente terapéutico y/o profiláctico de interés puede administrarse específicamente al hígado, riñón, bazo, fémur o pulmón de un mamífero. La administración específica a una clase particular de células, un órgano o un sistema o grupo de los mismos implica que una mayor proporción de composiciones de nanopartículas que incluyen un agente terapéutico y/o profiláctico se administran al destino (*por ejemplo*, tejido) de interés en relación con otros destinos, *por ejemplo*, tras la administración de 60 una composición de nanopartículas a un mamífero. En algunas realizaciones, la administración específica puede dar como resultado un aumento mayor de 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces o 20 veces en la cantidad de agente terapéutico y/o profiláctico por 1 g de tejido del destino objetivo (*por ejemplo*, tejido de interés, como un hígado) en comparación con otro destino (*por ejemplo*, el bazo). En algunas realizaciones, el tejido de interés se selecciona del grupo que consiste en un hígado, un riñón, un pulmón, un bazo, un fémur, un tejido ocular (*por ejemplo*, mediante inyección intraocular, subretinal o intravítreo), endotelio vascular en vasos (*por ejemplo*, intracoronario o intrafemoral) o riñón, y tejido tumoral (*por ejemplo*, mediante inyección intratumoral).

Como otro ejemplo de administración dirigida o específica, un ARNm que codifica un socio de unión a proteínas (*por ejemplo*, un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, una proteína de andamiaje o un péptido) o un receptor en una superficie celular puede incluirse en una composición de nanopartículas. Un ARNm puede 5 utilizarse adicional o alternativamente para dirigir la síntesis y localización extracelular de lípidos, carbohidratos u otros restos biológicos. Como alternativa, se pueden seleccionar otros elementos o agentes terapéuticos y/o profilácticos (*por ejemplo*, lípidos o ligandos) de una composición de nanopartículas en función de su afinidad por receptores particulares (*por ejemplo*, receptores de lipoproteínas de baja densidad) de modo que una 10 composición de nanopartículas pueda interactuar más fácilmente con una población de células objetivo que incluya los receptores. Por ejemplo, los ligandos pueden incluir, pero no se limitan a, miembros de un par de unión específico, anticuerpos, anticuerpos monoclonales, fragmentos Fv, fragmentos Fv de cadena simple (scFv), fragmentos Fab', fragmentos F(ab')2, anticuerpos de dominio único, anticuerpos camelizados y fragmentos de los mismos, anticuerpos humanizados y fragmentos de los mismos, y versiones multivalentes 15 de los mismos; reactivos de unión multivalentes que incluyen anticuerpos mono o biespecíficos tales como fragmentos Fv estabilizados con disulfuro, tándems scFv, diacuerpos, tricuerpos o tetracuerpos; y aptámeros, receptores y proteínas de fusión.

En algunas realizaciones, un ligando puede ser un anticuerpo unido a la superficie, que puede permitir el ajuste 20 de la especificidad de la diana celular. Esto es especialmente útil ya que se pueden generar anticuerpos altamente específicos contra un epítopo de interés para el sitio diana deseado. En una realización, se expresan múltiples anticuerpos en la superficie de una célula, y cada anticuerpo puede tener una especificidad diferente para una diana deseada. Estos enfoques pueden aumentar la avidez y especificidad de las interacciones diana.

Un ligando puede ser seleccionado, *por ejemplo*, por una persona experta en las técnicas biológicas, 25 basándose en la localización o función deseada de la célula. Por ejemplo, un ligando del receptor de estrógeno, tal como el tamoxifeno, puede dirigirse a las células de cáncer de mama dependientes de estrógeno que tienen un mayor número de receptores de estrógeno en la superficie celular. Otros ejemplos no limitantes de interacciones ligando/receptor incluyen CCR1 (*por ejemplo*, para el tratamiento de tejidos articulares inflamados o cerebro en artritis reumatoide y/o esclerosis múltiple), CCR7, CCR8 (*por ejemplo*, dirigidos al 30 tejido de los ganglios linfáticos), CCR6, CCR9, CCR10 (*por ejemplo*, dirigidos al tejido intestinal), CCR4, CCR10 (*por ejemplo*, dirigidos a la piel), CXCR4 (*por ejemplo*, para una transmigración mejorada general), HCELL (*por ejemplo*, para el tratamiento de la inflamación y trastornos inflamatorios, médula ósea), Alpha4beta7 (*por ejemplo*, dirigidos a la mucosa intestinal) y VLA-4NCAM-1 (*por ejemplo*, dirigidos al 35 endotelio). En general, cualquier receptor involucrado en la focalización (*por ejemplo*, metástasis del cáncer) puede aprovecharse para su uso en los métodos y composiciones descritos en el presente documento.

Las células objetivo pueden incluir, pero no se limitan a, hepatocitos, células epiteliales, células hematopoyéticas, células epiteliales, células endoteliales, células pulmonares, células óseas, células madre, 40 células mesenquimales, células neuronales, células cardíacas, adipocitos, células del músculo liso vascular, cardiomiositos, 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.

En algunas realizaciones, una composición de nanopartículas puede dirigirse a los hepatocitos. Se ha 45 demostrado que las apolipoproteínas tales como la apolipoproteína E (apoE) se asocian con composiciones de nanopartículas que contienen lípidos neutrales o casi neutrales en el cuerpo y se sabe que se asocian con receptores como los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) que se encuentran en la superficie de los hepatocitos. Por lo tanto, una composición de nanopartículas que incluye un componente lipídico con una carga neutra o casi neutra que se administra a un sujeto puede adquirir apoE en el cuerpo de un sujeto y 50 posteriormente puede administrar un agente terapéutico y/o profiláctico (*por ejemplo*, un ARN) a los hepatocitos, incluyendo los LDLR, de manera dirigida.

Métodos de tratamiento de enfermedades y trastornos

55 Las composiciones de nanopartículas pueden ser útiles para tratar una enfermedad, trastorno o afección. En particular, dichas composiciones pueden ser útiles en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o condición caracterizada por una actividad proteica o polipeptídica faltante o aberrante. Por ejemplo, una composición de nanopartículas que comprende un ARNm que codifica un polipéptido faltante o aberrante puede administrarse o suministrarse a una célula. La traducción posterior del ARNm puede producir el polipéptido, reduciendo o eliminando así un problema causado por la ausencia o actividad aberrante causada por el polipéptido. Debido 60 a que la traducción puede ocurrir rápidamente, los métodos y composiciones pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades, trastornos o afecciones agudas tales como sepsis, accidente cerebrovascular e infarto de miocardio. Un agente terapéutico y/o profiláctico incluido en una composición de nanopartículas también puede ser capaz de alterar la tasa de transcripción de una especie determinada, afectando así la expresión genética.

65 Las enfermedades, trastornos y/o afecciones caracterizadas por una actividad proteica o polipeptídica

disfuncional o aberrante para las cuales se puede administrar una composición incluyen, entre otras, enfermedades raras, enfermedades infecciosas (tanto como vacunas como terapias), cáncer y enfermedades proliferativas, enfermedades genéticas (*por ejemplo*, fibrosis quística), enfermedades autoinmunes, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares y renovasculares, trastornos de almacenamiento lisosomal y enfermedades metabólicas. Múltiples enfermedades, trastornos y/o afecciones pueden caracterizarse por la falta de actividad proteica (o por una disminución sustancial de tal manera que no se produce la función proteica adecuada). Es posible que dichas proteínas no estén presentes o que sean esencialmente no funcionales. Un ejemplo específico de una proteína disfuncional son las variantes de mutación sin sentido del gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), que producen una variante de proteína disfuncional de la proteína CFTR, que causa fibrosis quística. La presente divulgación proporciona un método para tratar dichas enfermedades, trastornos y/o afecciones en un sujeto mediante la administración de una composición de nanopartículas que incluye un ARN y un componente lipídico que incluye un lípido de acuerdo con la Fórmula (I), un fosfolípido (opcionalmente insaturado), un lípido PEG y un lípido estructural, en donde el ARN puede ser un ARNm que codifica un polipéptido que antagoniza o supera de otro modo una actividad proteica aberrante presente en la célula del sujeto.

La divulgación proporciona métodos que implican la administración de composiciones de nanopartículas que incluyen uno o más agentes terapéuticos y/o profilácticos y composiciones farmacéuticas que los incluyen. Los términos terapéutico y profiláctico se pueden utilizar indistintamente en el presente documento con respecto a las características y realizaciones de la presente divulgación. Las composiciones terapéuticas, o sus composiciones para diagnóstico por imágenes o profilácticas, se pueden administrar a un sujeto utilizando cualquier cantidad razonable y cualquier vía de administración eficaz para prevenir, tratar, diagnosticar u obtener imágenes de una enfermedad, trastorno y/o afección y/o cualquier otro propósito. La cantidad específica administrada a un sujeto determinado puede variar dependiendo de la especie, la edad y la condición general del sujeto; el propósito de la administración; la composición particular; el modo de administración; y similares. Las composiciones de acuerdo con la presente divulgación pueden formularse en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de una composición de la presente divulgación será decidido por un médico tratante dentro del alcance del buen juicio médico. El nivel de dosis específico terapéuticamente eficaz, profilácticamente eficaz o de otro modo apropiado (*por ejemplo*, para imágenes) para cualquier paciente en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen la gravedad de identidad de un trastorno que se esté tratando, si lo hubiera; uno o más agentes terapéuticos y/o profilácticos empleados; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el momento de administración, la vía de administración y la tasa de excreción de la composición farmacéutica específica empleada; la duración del tratamiento; los medicamentos utilizados en combinación o coincidentemente con la composición farmacéutica específica empleada; y factores similares bien conocidos en las artes médicas.

Una composición de nanopartículas que incluye uno o más agentes terapéuticos y/o profilácticos puede administrarse por cualquier vía. En algunas realizaciones, las composiciones, incluidas las composiciones profilácticas, diagnósticas o de imagenología que incluyen una o más composiciones de nanopartículas descritas en este documento, se administran por una o más de una variedad de vías, incluidas la oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraparenquimatoso, subcutánea, intraventricular, transdérmica o intradérmica, Inter dérmica, rectal, intravaginal, intraperitoneal, intraocular, subretinal, intravítreo, tópica (*por ejemplo*, mediante polvos, ungüentos, cremas, geles, lociones y/o gotas), mucosa, nasal, bucal, enteral, vítreo, intratumoral, sublingual, intranasal; por instilación intratraqueal, instilación bronquial y/o inhalación; como un aerosol y/o pulverización oral, aerosol nasal y/o aerosol, y/o a través de un catéter de vena porta. En algunas realizaciones, una composición puede administrarse por vía intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraarterial, intratumoral, subcutánea, intraocular, subretinal, intravítreo, intraparenquimal o por cualquier otra vía de administración parenteral o por inhalación. Sin embargo, la presente divulgación abarca la entrega o administración de las composiciones descritas en este documento por cualquier vía apropiada teniendo en cuenta los posibles avances en las ciencias de la administración de fármacos. En general, la vía de administración más adecuada dependerá de diversos factores, como la naturaleza de la composición de nanopartículas que incluya uno o más fármacos terapéuticos y/o profilácticos (*por ejemplo*, su estabilidad en varios entornos corporales, tales como el torrente sanguíneo y el tracto gastrointestinal), y el estado del paciente (*por ejemplo*, si el paciente es capaz de tolerar determinadas vías de administración), etc.

En ciertas realizaciones, las composiciones de acuerdo con la presente divulgación se pueden administrar a niveles de dosificación suficientes para administrar de aproximadamente 0.0001 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0.001 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0.005 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0.05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0.0001 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 0.001 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 0.005 mg/kg hasta aproximadamente 5 mg/kg, desde

aproximadamente 0.01 mg/kg hasta aproximadamente 5 mg/kg, desde aproximadamente 0.05 mg/kg hasta aproximadamente 5 mg/kg, desde aproximadamente 0.1 mg/kg hasta aproximadamente 5 mg/kg, desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 5 mg/kg, desde aproximadamente 2 mg/kg hasta aproximadamente 5 mg/kg, desde aproximadamente 0.0001 mg/kg hasta aproximadamente 2.5 mg/kg, desde

5 aproximadamente 0.001 mg/kg hasta aproximadamente 2.5 mg/kg, desde aproximadamente 0.005 mg/kg hasta aproximadamente 2.5 mg/kg, desde aproximadamente 0.01 mg/kg hasta aproximadamente 2.5 mg/kg, desde aproximadamente 0.05 mg/kg hasta aproximadamente 2.5 mg/kg, desde aproximadamente 0.1 mg/kg hasta aproximadamente 2.5 mg/kg, desde aproximadamente 2 mg/kg hasta aproximadamente 2.5 mg/kg, de aproximadamente 0.0001 mg/kg a

10 aproximadamente 1 mg/kg, de aproximadamente 0.001 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, de aproximadamente 0.005 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, de aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, de aproximadamente 0.05 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, de aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, de aproximadamente 0.0001 mg/kg a

15 aproximadamente 0.25 mg/kg, de aproximadamente 0.001 mg/kg a aproximadamente 0.25 mg/kg, de aproximadamente 0.005 mg/kg a aproximadamente 0.25 mg/kg, de aproximadamente 0.01 mg/kg a

20 aproximadamente 0.25 mg/kg, de aproximadamente 0.05 mg/kg a aproximadamente 0.25 mg/kg, o de aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 0.25 mg/kg de un terapéutico y/o profiláctico (*por ejemplo*, un ARNm) en una dosis determinada, donde una dosis de 1 mg/kg (mpk) proporciona 1 mg de un terapéutico y/o profiláctico por 1 kg de peso corporal del sujeto. En algunas realizaciones, se puede administrar una dosis de

25 aproximadamente 0.001 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de un agente terapéutico y/o profiláctico (*por ejemplo*, ARNm) de una composición de nanopartículas. En otras realizaciones, se puede administrar una dosis de aproximadamente 0.005 mg/kg a aproximadamente 2.5 mg/kg de un agente terapéutico y/o profiláctico. En ciertas realizaciones, se puede administrar una dosis de aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg. En otras realizaciones, se puede administrar una dosis de aproximadamente 0.05 mg/kg a

30 aproximadamente 0.25 mg/kg. Se puede administrar una dosis una o más veces al día, en la misma cantidad o en una cantidad diferente, para obtener un nivel deseado de expresión de ARNm y/o un efecto terapéutico, diagnóstico, profiláctico o de imagen. La dosis deseada se puede administrar, por ejemplo, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, cada dos días, cada tercer día, semanalmente, cada dos semanas, cada tres semanas o cada cuatro semanas. En determinadas realizaciones, es posible administrar la dosis deseada en administraciones múltiples (*por ejemplo*, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o más administraciones). En algunas realizaciones, se puede administrar una dosis única, por ejemplo, antes o después de un procedimiento quirúrgico o en el caso de una enfermedad, trastorno o afección aguda.

35 Las composiciones de nanopartículas que incluyen uno o más agentes terapéuticos y/o profilácticos se pueden usar en combinación con uno o más agentes terapéuticos, profilácticos, de diagnóstico o de imagen. Por "en combinación con", no se pretende implicar que los agentes deben administrarse al mismo tiempo y/o que deben formularse para su administración conjunta, aunque estos métodos de administración están dentro del alcance de la presente descripción. Por ejemplo, se pueden administrar en combinación una o más composiciones de nanopartículas que incluyen uno o más agentes terapéuticos y/o profilácticos diferentes. Las composiciones se pueden administrar simultáneamente con, antes o después de, uno o más de otros procedimientos terapéuticos o médicos deseados. En general, cada agente se administrará en una dosis y/o según un calendario determinado para ese agente. En algunas realizaciones, la presente divulgación abarca la administración de composiciones, o composiciones de diagnóstico, profilácticas o de imagenología de las mismas en combinación con agentes que mejoran su biodisponibilidad, reducen y/o modifican su metabolismo, inhiben su excreción y/o modifican su distribución dentro del cuerpo.

45 Se apreciará además que los agentes activos terapéuticos, profilácticos, de diagnóstico o de formación de imágenes utilizados en combinación pueden administrarse juntos en una sola composición o administrarse por separado en diferentes composiciones. En general, se espera que los agentes utilizados en combinación se utilicen en niveles que no excedan los niveles en que se utilizan individualmente. En algunas realizaciones, los niveles utilizados en combinación pueden ser inferiores a los utilizados individualmente.

55 La combinación particular de terapias (productos terapéuticos o procedimientos) para emplear en un régimen de combinación deberá tener en cuenta la compatibilidad de los productos terapéuticos y/o los procedimientos deseados y el efecto terapéutico deseado a conseguir. También se apreciará que las terapias empleadas pueden lograr un efecto deseado para el mismo trastorno (*por ejemplo*, una composición útil para tratar el cáncer puede administrarse simultáneamente con un agente quimioterapéutico), o pueden lograr efectos diferentes (*por ejemplo*, control de cualquier efecto adverso, como reacciones relacionadas con la infusión).

60 Una composición de nanopartículas puede utilizarse en combinación con un agente para aumentar la eficacia y/o la ventana terapéutica de la composición. Tal agente puede ser, por ejemplo, un compuesto antiinflamatorio, un esteroide (*por ejemplo*, un corticosteroide), una estatina, un estradiol, un inhibidor de BTK, un agonista de S1P1, un modulador del receptor de glucocorticoides (GRM) o un antihistamínico. En algunas realizaciones, una composición de nanopartículas se puede utilizar en combinación con dexametasona, metotrexato, acetaminofeno, un bloqueador del receptor H1 o un bloqueador del receptor H2. En algunas realizaciones, un

- método para tratar a un sujeto que lo necesita o para administrar un agente terapéutico y/o profiláctico a un sujeto (*por ejemplo*, un mamífero) puede implicar el tratamiento previo del sujeto con uno o más agentes antes de administrar una composición de nanopartículas. Por ejemplo, un sujeto puede ser tratado previamente con una cantidad útil (*por ejemplo*, 10 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg o 5 cualquier otra cantidad útil) de dexametasona, metotrexato, acetaminofeno, un bloqueador del receptor H1 o un bloqueador del receptor H2. El pretratamiento puede ocurrir 24 horas o menos (*por ejemplo*, 24 horas, 20 horas, 16 horas, 12 horas, 8 horas, 4 horas, 2 horas, 1 hora, 50 minutos, 40 minutos, 30 minutos, 20 minutos o 10 minutos) antes de la administración de la composición de nanopartículas y puede ocurrir una, dos o más veces, por ejemplo, en cantidades de dosis crecientes.
- 10 En las reivindicaciones, los artículos tales como "un", "una", "el" y "la" pueden significar uno o más de uno, a menos que se indique lo contrario o que resulte evidente a partir del contexto. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno o todos los miembros del grupo están presentes en, son empleados en o, de otra forma, son relevantes para un producto o proceso dado, a no ser que se indique lo contrario o que resulte evidente a partir del contexto. La divulgación incluye realizaciones en las que exactamente un miembro del grupo está presente, se emplea o de otro modo es relevante para un producto o proceso determinado. La divulgación incluye realizaciones en las que más de uno, o todos, los miembros del grupo están presentes, empleados o son de otro modo relevantes para un producto o proceso determinado. Como se usa en el presente documento, las expresiones "uno o más de A, B o C", "uno o más A, B o C", "uno o más de A, B y C", "uno o más A, B y C", "seleccionado de A, B y C", "seleccionado del grupo que consiste en A, B y C" y similares se usan indistintamente y todas se refieren a una selección de un grupo que consiste en A, B y/o C, es decir, uno o más A, uno o más B, uno o más C, o cualquier combinación de los mismos, a menos que se especifique lo contrario.
- 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
- También se indica que la expresión "que comprende" pretende ser abierta y permite, pero no requiere, la inclusión de elementos o etapas adicionales. Cuando en el presente documento se utiliza el término "que comprende", los términos "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" también quedan abarcados y divulgados. A lo largo de la descripción, cuando se describe que las composiciones tienen, incluyen o comprenden componentes específicos, se contempla que las composiciones también consisten esencialmente en, o consisten en, los componentes enumerados. De manera similar, cuando se describen métodos o procesos como que tienen, incluyen o comprenden pasos de proceso específicos, los procesos también consisten esencialmente en, o consisten en, las etapas de procesamiento recitados. Además, debe entenderse que el orden de las etapas o el orden para realizar determinadas acciones es irrelevante siempre que la invención siga siendo operativa. Además, se pueden realizar dos o más etapas o acciones simultáneamente.
- Cuando se proporcionan intervalos, se incluyen los puntos finales. Además, se debe entender que, a menos que se indique lo contrario o sea evidente a partir del contexto y la comprensión de una persona con conocimientos ordinarios en la materia, los valores que se expresan como rangos pueden asumir cualquier valor o subrango específico dentro de los rangos establecidos en diferentes realizaciones de la divulgación, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior del rango, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.
- Los procesos sintéticos de la divulgación pueden tolerar una amplia variedad de grupos funcionales, por lo tanto, se pueden utilizar diversos materiales de partida sustituidos. Los procesos generalmente proporcionan el compuesto final deseado al final o cerca del final del proceso general, aunque puede ser deseable en ciertos casos convertir aún más el compuesto en una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- Los compuestos de la presente divulgación se pueden preparar de diversas maneras utilizando materiales de partida disponibles comercialmente, compuestos conocidos en la literatura o a partir de intermedios fácilmente preparados, empleando métodos y procedimientos sintéticos estándar conocidos por aquellos expertos en la materia o que serán evidentes para el técnico experto a la luz de las enseñanzas del presente documento. Los métodos y procedimientos sintéticos estándar para la preparación de moléculas orgánicas y las transformaciones y manipulaciones de grupos funcionales se pueden obtener de la literatura científica pertinente o de los libros de texto estándar en el campo. Aunque no se limita a una o varias fuentes, textos clásicos como Smith, M.B., March, J., March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, y Structure, 5.^a edición, John Wiley & Sons: Nueva York, 2001; Greene, T.W., Wuts, P.G.M., Protective Groups in Organic Synthesis, 3.^a edición, John Wiley & Sons: Nueva York, 1999; R. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers (1989); L. Fieser y M. Fieser, Fieser y Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley y Sons (1994); y L. Paquette, ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley y Sons (1995) son libros de texto de referencia útiles y reconocidos de síntesis orgánica conocidos por los expertos en la materia. Las siguientes descripciones de métodos sintéticos están diseñadas para ilustrar, pero no para limitar, los procedimientos generales para la preparación de compuestos de la presente divulgación.
- Además, se debe entender que cualquier realización particular de la presente divulgación que se encuentre dentro de la técnica anterior puede excluirse explícitamente de una o más de las reivindicaciones. Dado que

dichas realizaciones se consideran conocidas para un experto en la técnica, pueden excluirse, aunque la exclusión no se establezca explícitamente en la presente.

Ejemplos

5

Ejemplo 1: Síntesis de los compuestos 1-280

Las síntesis de los compuestos 1-280 se describen en la publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2017/049245y la solicitud copendiente N.º PCT/US2018/22717.

10

Ejemplo 2: Producción de composiciones de nanopartículas

A. Producción de composiciones de nanopartículas

15 Con el fin de investigar composiciones de nanopartículas seguras y eficaces para su uso en la administración de agentes terapéuticos y/o profilácticos a las células, se preparan y prueban una variedad de formulaciones. Específicamente, se optimizan los elementos particulares y sus proporciones en el componente lipídico de las composiciones de nanopartículas.

20 Las nanopartículas se pueden fabricar con procesos de mezcla como la microfluídica y la mezcla de uniones en T de dos corrientes de fluidos, una de las cuales contiene los componentes terapéuticos y/o profilácticos y la otra tiene los componentes lipídicos.

25 Las composiciones lipídicas se preparan combinando un lípido de acuerdo con la Fórmula (I), (IA), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe), (IIf) o un fosfolípido (tal como DOPE o DSPC, obtenible de Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), un lípido PEG (tal como 1,2-dimiristoil-sn-glicerol metoxipolienglicol, también conocido como PEG-DMG, obtenible de Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), y un lípido estructural (tal como colesterol, obtenible de Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania, derivado de colesterol, o una mezcla de colesterol y derivado de colesterol) en concentraciones de aproximadamente, por ejemplo, 50 mM en un solvente, por ejemplo, etanol.

30 Las soluciones deben refrigerarse para su almacenamiento a, por ejemplo, -20 °C. Los lípidos se combinan para obtener las proporciones molares deseadas (véase, por ejemplo, la Tabla 1 a continuación) y se diluyen con agua y etanol hasta una concentración final de lípidos de, por ejemplo, entre aproximadamente 5.5 mM y aproximadamente 25 mM. Chol* en la Tabla 1 se refiere al colesterol, al derivado del colesterol o a una combinación de ellos.

35

Tabla 1. Formulaciones ejemplares que incluyen compuestos según la Fórmula (I), (IA), (IB), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe), (IIf) o (IIg).

Composición (% en moles)	Componentes
40:20:38.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Chol*:PEG-DMG
45:15:38.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Chol*:PEG-DMG
50:10:38.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Chol*:PEG-DMG
55:5:38.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Chol*:PEG-DMG
60:5:33.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Chol*:PEG-DMG
45:20:33.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Chol*:PEG-DMG
50:20:28.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Chol*:PEG-DMG
55:20:23.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Chol*:PEG-DMG
60:20:18.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Chol*:PEG-DMG
40:15:43.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Chol*:PEG-DMG
50:15:33.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Chol*:PEG-DMG
55:15:28.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Chol*:PEG-DMG
60:15:23.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Chol*:PEG-DMG
40:10:48.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Chol*:PEG-DMG
45:10:43.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Chol*:PEG-DMG
55:10:33.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Chol*:PEG-DMG
60:10:28.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Chol*:PEG-DMG

Composición (% en moles)	Componentes
40:5:53.5:1.5	Compuesto:Fosfolípido:Chol*:PEG-DMG
45:5:48.5:1.5	Compuesto:Fosfolípido:Chol*:PEG-DMG
50:5:43.5:1.5	Compuesto:Fosfolípido:Chol*:PEG-DMG
40:20:40:0	Compuesto:Fosfolípido:Chol*:PEG-DMG
45:20:35:0	Compuesto: Fosfolípido: Chol*:PEG-DMG
50:20:30:0	Compuesto:Fosfolípido:Chol*:PEG-DMG
55:20:25:0	Compuesto: Fosfolípido: Chol*:PEG-DMG
60:20:20:0	Compuesto:Fosfolípido:Chol*:PEG-DMG
40:15:45:0	Compuesto:Fosfolípido:Chol*:PEG-DMG
45:15:40:0	Compuesto:Fosfolípido:Chol*:PEG-DMG
50:15:35:0	Compuesto: Fosfolípido: Chol*:PEG-DMG
55:15:30:0	Compuesto: Fosfolípido: Chol*:PEG-DMG
60:15:25:0	Compuesto:Fosfolípido:Chol*:PEG-DMG
40:10:50:0	Compuesto:Fosfolípido:Chol*:PEG-DMG
45:10:45:0	Compuesto:Fosfolípido:Chol*:PEG-DMG
50:0:48.5:1.5	Compuesto:Fosfolípido:Chol*:PEG-DMG
50:10:40:0	Compuesto:Fosfolípido:Chol*:PEG-DMG
55:10:35:0	Compuesto: Fosfolípido: Chol*:PEG-DMG
60:10:30:0	Compuesto:Fosfolípido:Chol*:PEG-DMG

- Las composiciones de nanopartículas que incluyen un componente terapéutico y/o profiláctico y un componente lipídico se preparan combinando la solución lipídica con una solución que incluye el componente terapéutico y/o profiláctico en proporciones peso:peso del componente lipídico al componente terapéutico y/o profiláctico de entre aproximadamente 5:1 y aproximadamente 50:1. La solución lipídica se inyecta rápidamente utilizando un sistema basado en microfluidos NanoAssemblr a velocidades de flujo de entre aproximadamente 10 ml/min y aproximadamente 18 ml/min en la solución terapéutica y/o profiláctica para producir una suspensión con una proporción agua:etanol de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 4:1.
- 5 10 Para composiciones de nanopartículas que incluyen un ARN, se diluyen soluciones de ARN en concentraciones de 0.1 mg/ml en agua desionizada en un tampón, por ejemplo, tampón de citrato de sodio 50 mM a un pH entre 3 y 4 para formar una solución madre.

15 Las composiciones de nanopartículas se pueden procesar mediante diálisis para eliminar el etanol y lograr el intercambio de tampón. Las formulaciones se dializan dos veces contra solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7.4, en volúmenes 200 veces superiores al del producto primario utilizando cassetes Slide-A-Lyzer (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL) con un límite de peso molecular de 10 kDa. La primera diálisis se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 3 horas. A continuación, las formulaciones se dializan toda la noche a 4 °C. La suspensión de nanopartículas resultante se filtra a través de filtros estériles de 0.2 µm (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) en viales de vidrio y se sella con cierres de presión. Se obtienen generalmente soluciones de composición de nanopartículas de 0.01 mg/ml a 0.10 mg/ml.

20 El método descrito anteriormente induce la nanoprecipitación y la formación de partículas. Se pueden usar procesos alternativos que incluyen, pero no se limitan a, unión en T e inyección directa, para lograr la misma nanoprecipitación.

B. Caracterización de las composiciones de nanopartículas

25 Se puede utilizar un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, Reino Unido) para determinar el tamaño de partícula, el índice de polidispersidad (PDI) y el potencial zeta de las composiciones de nanopartículas en 1×PBS para determinar el tamaño de partícula y 15 mM de PBS para determinar el potencial zeta.

30 La espectroscopia ultravioleta-visible se puede utilizar para determinar la concentración de un agente terapéutico y/o profiláctico (por ejemplo, ARN) en composiciones de nanopartículas. Se añaden 100 µL de la

- 5 formulación diluida en 1×PBS a 900 µL de una mezcla 4:1 (v/v) de metanol y cloroformo. Despues de mezclar, se registra el espectro de absorbancia de la solución, por ejemplo, entre 230 nm y 330 nm en un espectrofotómetro DU 800 (Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA). La concentración de agente terapéutico y/o profiláctico en la composición de nanopartículas se puede calcular en función del coeficiente de extinción del agente terapéutico y/o profiláctico utilizado en la composición y de la diferencia entre la absorbancia a una longitud de onda de, por ejemplo, 260 nm y el valor de referencia a una longitud de onda de, por ejemplo, 330 nm.
- 10 Para las composiciones de nanopartículas que incluyen un ARN, se puede utilizar un ensayo de ARN QUANT-IT™ RIBOGREEN® (Invitrogen Corporation Carlsbad, CA) para evaluar la encapsulación de un ARN por la composición de nanopartículas. Las muestras se diluyen a una concentración de aproximadamente 5 µg/mL en una solución tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5). Se transfieren 50 µL de las muestras diluidas a una placa de poliestireno de 96 pocillos y se añaden bien 50 µL de tampón TE o 50 µL de una solución al 2 % de Tritón X-100 a los pocillos. La placa se incuba a una temperatura de 37 °C durante 15 minutos. El reactivo RIBOGREEN® se diluye 1:100 en tampón TE y se añaden 100 µL de esta solución a cada pocillo. La intensidad de la fluorescencia puede medirse utilizando un lector de placas de fluorescencia (Wallac Victor 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer, Waltham, MA) a una longitud de onda de excitación de, por ejemplo, aproximadamente 480 nm y una longitud de onda de emisión de, por ejemplo, aproximadamente 520 nm. Los valores de fluorescencia del blanco de reactivo se restan de los de cada una de las muestras y el porcentaje de ARN libre se determina dividiendo la intensidad de fluorescencia de la muestra intacta (sin la adición de Tritón X-100) por el valor de fluorescencia de la muestra fragmentada (causado por la adición de Tritón X-100).
- 15 C. Estudios de formulación *in vivo*
- 20 Para monitorear la eficacia con la que varias composiciones de nanopartículas suministran agentes terapéuticos y/o profilácticos a células específicas, se preparan y administran diferentes composiciones de nanopartículas que incluyen un agente terapéutico y/o profiláctico particular (por ejemplo, un ARN modificado o de origen natural, como un ARNm) a poblaciones de roedores. A los ratones se les administra por vía intravenosa, intramuscular, intraarterial o intratumoral una dosis única que incluye una composición de nanopartículas con una formulación de nanopartículas lipídicas. En algunos casos, se puede obligar a los ratones a inhalar dosis. Los tamaños de dosis pueden variar de 0.001 mg/kg a 10 mg/kg, donde 10 mg/kg describe una dosis que incluye 10 mg de un agente terapéutico y/o profiláctico en una composición de nanopartículas por cada 1 kg de masa corporal del ratón. También se puede emplear una composición de control que incluya PBS.
- 25 Tras la administración de composiciones de nanopartículas a ratones, los perfiles de administración de dosis, las respuestas a las dosis y la toxicidad de formulaciones particulares y dosis de las mismas se pueden medir mediante ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), imágenes bioluminiscentes u otros métodos. Para las composiciones de nanopartículas que incluyen ARNm, también se pueden evaluar los cursos temporales de la expresión de proteínas. Las muestras recolectadas de los roedores para su evaluación pueden incluir sangre, suero y tejido (por ejemplo, tejido muscular del sitio de una inyección intramuscular y tejido interno); la recolección de muestras puede implicar el sacrificio de los animales.
- 30 40
- 35
- 45
- 50
- 55
- 60
- Las composiciones de nanopartículas que incluyen ARNm son útiles en la evaluación de la eficacia y utilidad de varias formulaciones para la administración de agentes terapéuticos y/o profilácticos. Los niveles más elevados de expresión de proteínas inducidos por la administración de una composición que incluye un ARNm serán indicativos de una mayor traducción del ARNm y/o eficiencias de administración del ARNm de la composición de nanopartículas. Como no se cree que los componentes que no son ARN afecten a las maquinarias de traducción en sí, un nivel más alto de expresión de proteínas probablemente sea indicativo de una mayor eficiencia en la administración del agente terapéutico y/o profiláctico por una composición de nanopartículas dada en relación con otras composiciones de nanopartículas o la ausencia de las mismas.
- Ejemplo 3: Evaluación de formulaciones lipídicas con sustitutos del colesterol
- Se probó *in vitro* el efecto de reemplazar parcial o totalmente el colesterol en formulaciones de lípidos comunes sobre la expresión de proteínas y la captación de lípidos. En la Tabla 2 se presentan formulaciones ejemplares en las que el colesterol fue reemplazado total o parcialmente por nuevos lípidos con propiedades antiinflamatorias ("material de prueba").
- Tabla 2. Formulaciones ejemplares que incluyen colesterol parcial o totalmente reemplazado (formulaciones comparativas marcadas con *)

Formulación	Material de prueba	Relación molar	%EE	[ARNm], ug/mL	Tamaño (nm)	PDI
Compuesto 18: DSPC: Chol:PEG(2k)-DMG*	-	50:10:38.5:1.5	95	59.4	84.6	0.19
Compuesto 18: DSPC: Chol: material de prueba: PEG(2k)-DMG*	Lupeol	50:10:20:18.5:1.5	91	62.3	90.5	0.16
Compuesto 18: DSPC: Chol: material de prueba: PEG(2k)-DMG	Estigmasterol	50:10:20:18.5:1.5	94	61.7	90.9	0.20

Entre las formulaciones de la Tabla 2, la que comprende tanto colesterol como estigmasterol (es decir, colesterol parcialmente reemplazado con estigmasterol) mostró la mayor expresión de eGFP y, por lo tanto, se seleccionó para una mayor optimización. La combinación de colesterol y Lupeol (es decir, colesterol parcialmente reemplazado con Lupeol) mostró una mayor expresión de que el control de colesterol. Se evaluaron intervalos de estigmasterol de 1 a 37.5 % en moles en nanopartículas líquidas. En la Tabla 3 se resumen las características de las partículas para formulaciones que contienen diferentes proporciones de colesterol y estigmasterol.

10 Tabla 3. Características de las composiciones de nanopartículas que incluyen el Compuesto 18, colesterol y estigmasterol.

% colesterol	% estigmasterol	Tamaño (nm)	PDI	%EE
1.0 %	37.5 %	164.9	0.23	12.0
10.0 %	28.5 %	126.4	0.16	48.5
20.0 %	18.5 %	90.9	0.20	89.3
30.0 %	8.5 %	76.8	0.15	94.7
37.5 %	1.0 %	78.4	0.23	95.4
38.5 %##	0.0 %	86.2	0.22	98.1
20.0 %##	18.5 %	99.3	0.22	92.8

##Formulado con rodamina-DOPE

15 Se prepararon y probaron *in vitro* formulaciones que comprendían diferentes fitoesteroles (por ejemplo, β -sitosterol y estigmasterol). Se varió la cantidad relativa de fitoesterol en cada composición de nanopartículas para optimizar la formulación. Se seleccionó el compuesto 18 para su uso en la composición de nanopartículas. Se prepararon composiciones de nanopartículas con contenidos relativos de colesterol y derivados de colesterol que variaban independientemente entre 0 % en moles y 38.5 % en moles. Las formulaciones se prepararon en lotes fluorescentes y no fluorescentes. Luego se evaluaron las composiciones según su tamaño y eficacia de encapsulación. En la Tabla 4 se presentan formulaciones ejemplares útiles para la optimización de formulaciones de composiciones de nanopartículas. Las características de las composiciones de nanopartículas que comprenden colesterol y fitoesterol, y las composiciones que comprenden colesterol, fitoesterol o una combinación de los mismos, se resumen en las Tablas 5-7.

20 Tabla 4. Formulaciones que incluyen el compuesto 18, colesterol y fitoesterol

Formulación	Chol. Derivada (% en moles)	Colesterol (% en moles)
Colesterol	0	38.5
β -sitosterol 38.5**	38.5	0
β -sitosterol 28.5**	28.5	10
β -sitosterol 18.5**	18.5	20
Estigmasterol 38.5**	38.5	0
Estigmasterol 28.5**	28.5	10
Estigmasterol 18.5**	18.5	20

25 **: Formulado con Compuesto 18: DSPC: Derivado del colesterol: Colesterol: PEG-DMG

Tabla 5. Características de las composiciones de nanopartículas que comprenden colesterol y fitoesterol

Muestra	Diámetro (nm)	PDI	Eficacia de encapsulación (%)
Colesterol	114.4±34.04	0.077	90.6
Estigmasterol	150.5±46.89	0.199	13.3
β-sitosterol	110.4±25.68	0.042	91.3

Tabla 6. Características de las composiciones de nanopartículas que incluyen el compuesto 18 (tampón acetato)

5

Muestra	Diámetro (nm)	PDI	Eficacia de encapsulación (%)
Colesterol	77.3	0.15	97
Colesterol fluorescente	76.1	0.16	98
β-sitosterol 38.5	159.1	0.22	49
β-Sitosterol 38.5, fluorescente	146	0.22	59
β-sitosterol 28.5	107.5	0.23	94
β-Sitosterol 28.5, fluorescente	106.3	0.20	93
β-sitosterol 18.5	77.5	0.09	98
β-Sitosterol 18.5, fluorescente	76.8	0.09	98
Estigmasterol 38.5	145.3	0.18	5
Estigmasterol 38.5, fluorescente	128.1	0.16	2
Estigmasterol 28.5	137.6	0.16	38
Estigmasterol 28.5, fluorescente	135.4	0.14	43
Estigmasterol 18.5	89.4	0.18	96
Estigmasterol 18.5, fluorescente	95.1	0.21	95

Tabla 7. Características de las composiciones de nanopartículas que incluyen el Compuesto 18 (tampón citrato)

Muestra	Diámetro (nm)	PDI	Eficacia de encapsulación (%)
Colesterol, fluorescente	68.3	0.15	99
β-Sitosterol 38.5, fluorescente	97.8	0.14	94
β-Sitosterol 28.5, fluorescente	83.5	0.11	98
β-Sitosterol 18.5, fluorescente	72.2	0.11	98
Estigmasterol 38.5, fluorescente	149.2	0.21	3
Estigmasterol 28.5, fluorescente	117.3	0.18	59
Estigmasterol 18.5, fluorescente	79.1	0.12	98

10 Ejemplo 4: Estudio *in vitro* de formulaciones de muestra

Se evaluó la conexión entre la captación celular de nanopartículas lipídicas y la expresión de proteínas, así como la activación de células B, inducida por composiciones de la divulgación. Las líneas de células humanas se pusieron en contacto *in vitro* con composiciones de nanopartículas de acuerdo con la Tabla 6 y se evaluaron los niveles de expresión de proteínas y la captación celular. Los resultados de estos estudios se muestran en las Figuras 2-6. No existe una diferencia importante entre fluorescente y no fluorescente en términos de expresión de proteínas. En las Figuras 2-6, "Chol (Ctrl)" indica que no hay reemplazo de colesterol, "Beta" se refiere a β-sitosterol, "estigma" se refiere a estigmasterol y "Fluor" se refiere al lote fluorescente correspondiente.

15

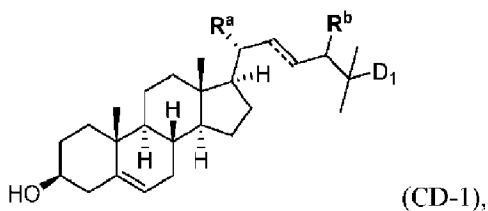
Las composiciones probadas mostraron tendencias de captación y expresión similares en células HeLa, Hep3b (carcinoma hepatocelular humano) y AML12 (hepatocito de ratón). Se encontró que la expresión de proteínas con composiciones de la divulgación, es decir, composiciones que comprenden colesterol y un derivado del colesterol (tal como un fitosterol), era 30-50 veces mayor que la de la composición estándar (es decir, sin

20

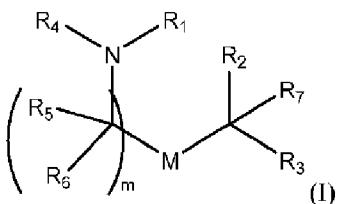
reemplazo de colesterol). Además, se encontró que la expresión de proteínas con las composiciones que comprenden un reemplazo del 99.5 % - 100 % de colesterol con β -sitosterol era 100-200 veces mayor que la de la composición estándar (es decir, sin reemplazo de colesterol). Véase, por ejemplo, la Figura 8d. Se encontró que la activación de las células B estaba en niveles de control del medio.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de nanopartículas que comprende un componente lipídico que comprende
 5 un lípido ionizable,
 un fosfolípido,
 colesterol, y
 10 un derivado del colesterol, en donde la relación molar entre el colesterol y el derivado del colesterol está entre aproximadamente 1:100 y 100:1; en donde el derivado del colesterol es:
 15 (a) β -sitosterol, campesterol, estigmasterol, fucosterol o estigmastanol; o
 (b) un compuesto de Fórmula (CD-1):



- 20 o una sal o isómero del mismo, en el que ---- denota un enlace simple o doble carbono-carbono; R^a es alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido con OH o halo; R^b es alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido con OH o halo; y D₁ es H o F.
- 25 2. La composición de nanopartículas de la reivindicación 1, en donde el derivado de colesterol es β -sitosterol.
3. La composición de nanopartículas de la reivindicación 1 o 2, en donde el lípido ionizable es un compuesto de Fórmula (I):



- 30 o su N-óxido, o una sal o isómero del mismo, en donde
 R₁ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₅₋₃₀, alquenilo C₅₋₂₀, -R*YR", -YR", y -R"MR";
 R₂ y R₃ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C₁₋₁₄, alquenilo C₂₋₁₄, -R*YR", -YR" y -R*OR" o R₂ y R₃, junto con el átomo al que están unidos, forman un heterociclo o carbociclo;
 R₄ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un carbociclo C₃₋₆ , -(CH₂)_nQ, -(CH₂)_nCHQR, -CHQR, -CQ(R)₂, y alquilo C₁₋₆ no sustituido, donde Q se selecciona de un carbociclo, heterociclo, -OR, -O(CH₂)_nN(R)₂, -C(O)OR, -OC(O)R, -CX₃, -CX₂H, -CXH₂, -CN, -N(R)₂, -C(O)N(R)₂, -N(R)C(O)R, -N(R)S(O)₂R, -N(R)C(O)N(R)₂, -N(R)C(S)N(R)₂, -N(R)R₈, -N(R)S(O)₂R₈, -O(CH₂)_nOR, -N(R)C=NR₉N(R)₂, -N(R)C(=CHR₉)N(R)₂, -OC(O)N(R)₂, -N(R)C(O)OR, -N(OR)C(O)R, -N(OR)S(O)₂R, -N(OR)C(O)OR, -N(OR)C(O)N(R)₂, -N(OR)C(S)N(R)₂, -N(OR)C=NR₉N(R)₂, -N(OR)C(=CHR₉)N(R)₂, -C(=NR₉)N(R)₂, -C(=NR₉)R, -C(O)N(R)OR, y -C(R)N(R)₂C(O)OR, y cada n se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4 y 5;
 45 cada R₅ se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C₁₋₃, alquenilo C₂₋₃, y H;
 cada R₆ se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C₁₋₃, alquenilo C₂₋₃, y H;
 50 M y M' se seleccionan independientemente de -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)-M"-C(O)O-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(S)S-, -SC(S)-, -CH(OH)-, -P(O)(OR')O-, -S(O)₂-, -S-S-, un grupo arilo y un grupo heteroarilo, en el que M" es un enlace, alquilo C₁₋₁₃ o alquenilo C₂₋₁₃;

R₇ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁₋₃, alquenilo C₂₋₃, y H;

R₈ se selecciona del grupo que consiste en carbociclo y heterociclo C₃₋₆;

- 5 R₉ se selecciona del grupo que consiste en H, CN, NO₂, alquilo C₁₋₆, -OR, -S(O)₂R, -S(O)₂N(R)₂, alquenilo C₂₋₆, carbociclo y heterociclo C₃₋₆;

cada R se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C₁₋₃, alquenilo C₂₋₃, y H;

- 10 cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C₁₋₁₈, alquenilo C₂₋₁₈, -R*YR'', -YR'', y H;

cada R'' se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C₃₋₁₅ y alquenilo C₃₋₁₅;

- 15 cada R* se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C₁₋₁₂ y alquenilo C₂₋₁₂;

cada Y es independientemente un carbociclo C₃₋₆;

cada X se selecciona independientemente del grupo que consiste en F, Cl, Br y I; y

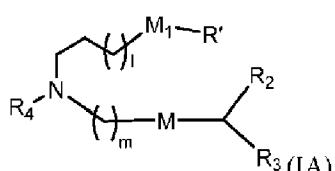
- 20 m se selecciona de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13;

opcionalmente en la que:

- 25 (a) cuando R₄ es -(CH₂)_nQ, -(CH₂)_nCHQR, -CHQR, o -CQ(R)₂, entonces (i) Q no es -N(R)₂ cuando n es 1, 2, 3, 4 o 5, o (ii) Q no es heterocicloalquilos de 5, 6, o 7 miembros cuando n es 1 o 2; y/o R₁ es diferente de -(CHR₅R₆)_m-M-CR₂R₃R₇; y/o

(b) el lípido ionizable es un compuesto de:

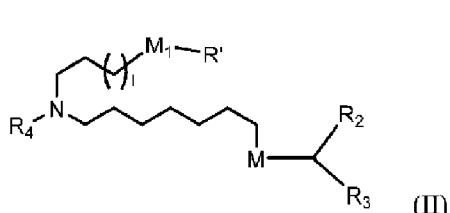
- 30 (b-1) Fórmula (IA):



- 35 o su N-óxido, o una sal o isómero del mismo, en donde: I se selecciona de 1, 2, 3, 4 y 5; m se selecciona de 5, 6, 7, 8 y 9; M₁ es un enlace o M'; R₄ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ no sustituido, o -(CH₂)_nQ, en el que Q es OH, -NHC(S)N(R)₂, -NHC(O)N(R)₂, -N(R)C(O)R, -N(R)S(O)₂R, -N(R)R₈, -N(R)S(O)₂R₈, -NHC(=NR₉)N(R)₂, -NHC(=CHR₉)N(R)₂, -OC(O)N(R)₂, -N(R)C(O)OR, -N(OR)C(O)R, -N(OR)S(O)₂R, -N(OR)C(O)OR, -N(OR)C(O)N(R)₂, -N(OR)C(S)N(R)₂, -N(OR)C(=NR₉)N(R)₂, -N(OR)C(=CHR₉)N(R)₂, heteroarilo o

- 40 heterocicloalquilo; M y M' se seleccionan independientemente de -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)-M'-C(O)O-, -C(O)N(R')-, -P(O)(OR')O-, -S-S-, un grupo arilo y un grupo heteroarilo; y R₂ y R₃ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C₁₋₁₄, y alquenilo C₂₋₁₄; o

- (b-2) Fórmula (II):



o su N-óxido, o una sal o isómero del mismo, en donde

- 50 I se selecciona de 1, 2, 3, 4 y 5;

M₁ es un enlace o M';

- 55 R₄ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ no sustituido, o -(CH₂)_nQ, en el que n es 2, 3, o 4 y Q es -OH, -NHC(S)N(R)₂, -NHC(O)N(R)₂, -N(R)C(O)R, -N(R)S(O)₂R, -N(R)R₈, -N(R)S(O)₂R₈, -NHC(=NR₉)N(R)₂, -NHC(=CHR₉)N(R)₂,

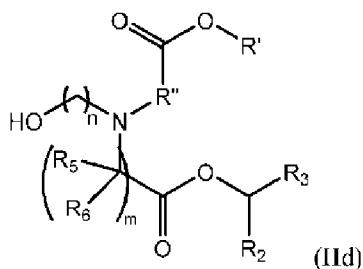
OC(O)N(R)_2 , $-\text{N(R)C(O)OR}$, $-\text{N(OR)C(O)R}$, $-\text{N(OR)S(O)}_2\text{R}$, $-\text{N(OR)C(O)OR}$, $-\text{N(OR)C(O)N(R)}_2$, $-\text{N(OR)C(S)N(R)}_2$, $-\text{N(OR)C(=NR_9)N(R)}_2$, $-\text{N(OR)C(=CHR_9)N(R)}_2$, heteroarilo o heterocicloalquilo;

5 M y M' se seleccionan independientemente entre $-\text{C(O)O}-$, $-\text{OC(O)}-$, $-\text{C(O)N(R')}-$, $-\text{OC(O)-M''-C(O)O}-$, $-\text{P(O)(OR')O}-$, $-\text{S-S-}$, un grupo arilo y un grupo heteroarilo; y

R₂ y R₃ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C₁₋₁₄, y alquenilo C₂₋₁₄; o

(b-3) Fórmula (IIId):

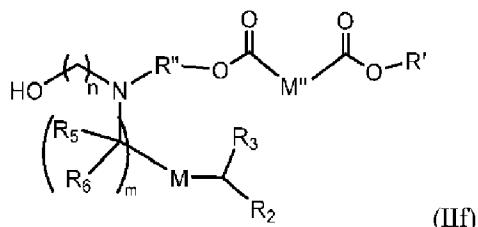
10



o su N-óxido, o una sal o isómero del mismo, en donde R₂ y R₃ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo C₅₋₁₄ y alquenilo C₅₋₁₄, y n se selecciona de 2, 3 y 4; o

15

(b-4) Fórmula (IIIe):



20 o su N-óxido, o una sal o isómero del mismo, en donde M es $-\text{C(O)O}-$ o $-\text{OC(O)}-$, M'' es alquilo C₁₋₆ o alquenilo C₂₋₆, R₂ y R₃ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo C₅₋₁₄ y alquenilo C₅₋₁₄, y n se selecciona de 2, 3 y 4;

y/o

25

(c) el lípido ionizable se selecciona del grupo que consiste en los compuestos 1-280.

4. Composición de nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el fosfolípido se selecciona del grupo que consiste en 1,2-dilinoleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DLPC), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-fosfocolina (DMPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-diundecanoil-sn-glicero-fosfocolina (DUPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1,2-di-O-octadecenil-sn-glicero-3-fosfocolina (18:0 Diether PC), 1-oleoil-2-colesterolhemisuccinoil-sn-glicero-3-fosfocolina (OChemsPC), 1-hexadecil-sn-glicero-3-fosfocolina (C16 Lyso PC), 1,2-dilinolenoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-diaraquidonooil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-didocosahexaenoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (ME 16.0 PE), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dilinoleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dilinolenoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-diaraquidonooil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-didocosahexaenoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol) sal sódica (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina (POPE), diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE), 1-estearoil-2-oleoilfosfatidiletanolamina (SOPE), 1-estearoil-2-oleoilfosfatidilcolina (SOPC), esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilslerina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, palmitoiloleoil fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina (LPE) y mezclas de los mismos.

45

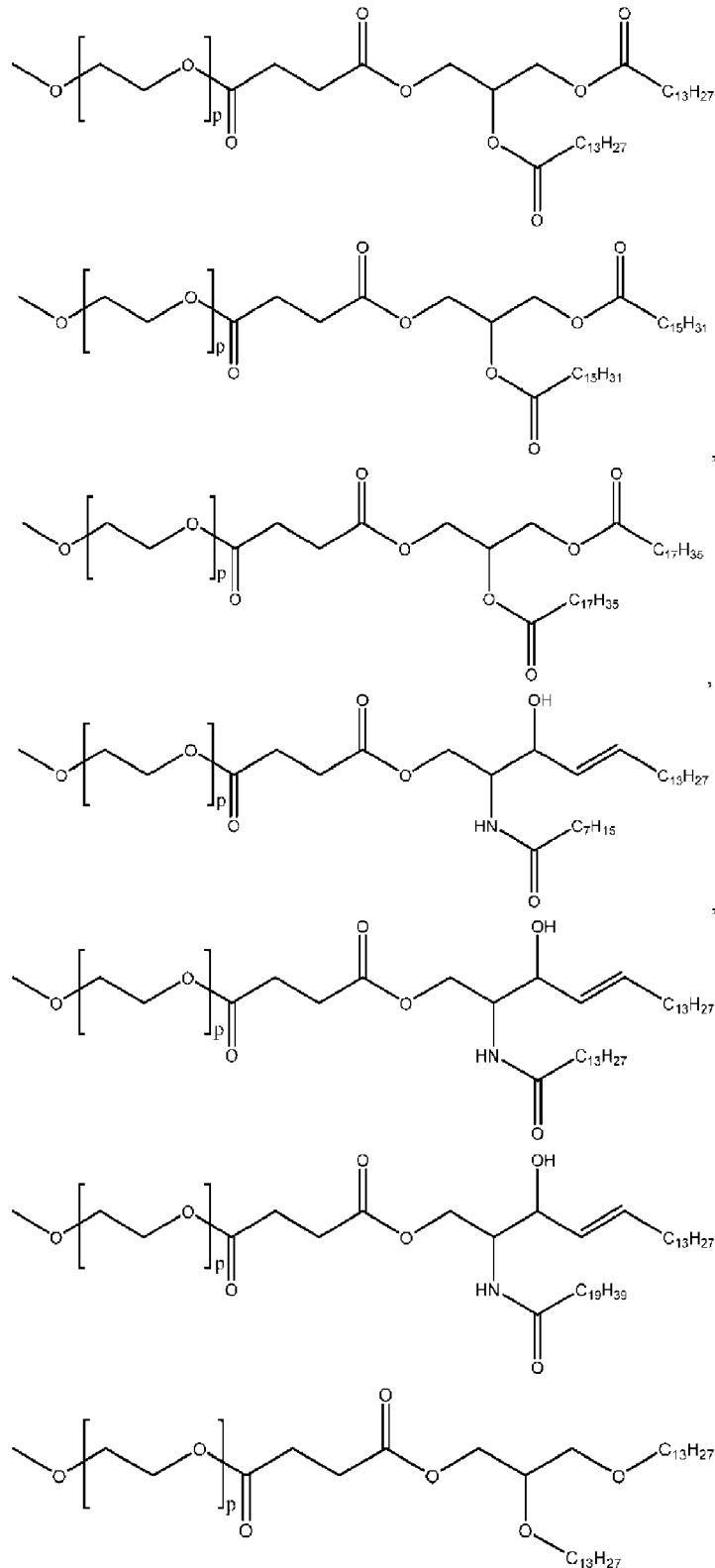
5. La composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además un lípido PEG;

50 opcionalmente en donde el lípido PEG se selecciona del grupo que consiste en una fosfatidiletanolamina modificada con PEG, un ácido fosfatídico modificado con PEG, una ceramida modificada con PEG, una

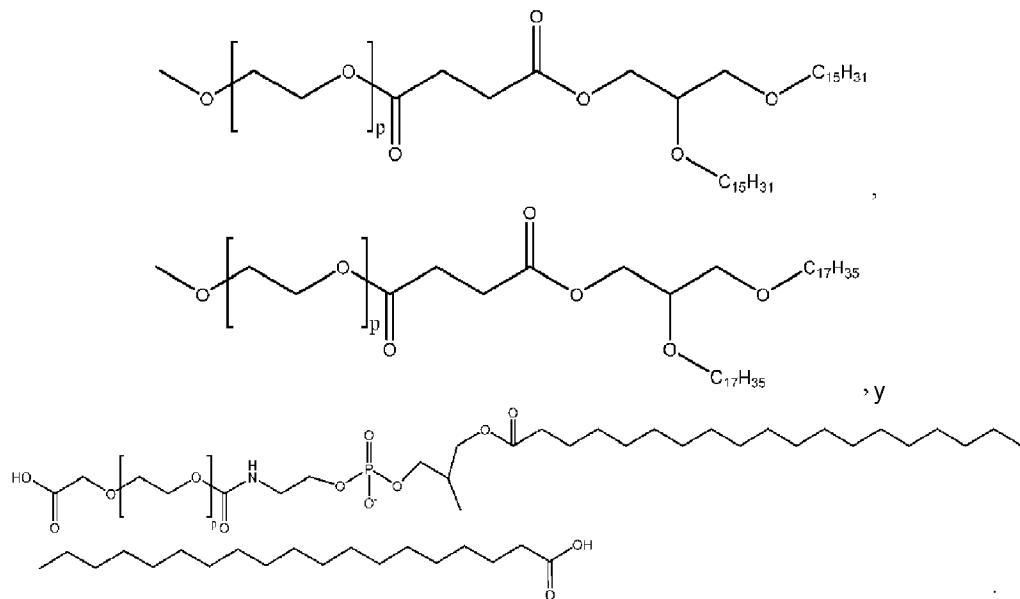
dialquilamina modificada con PEG, un diacilglicerol modificado con PEG, un dialquilglicerol modificado con PEG y mezclas de los mismos;

además, opcionalmente, el lípido PEG se selecciona de

5



10



5

en donde p es de 1 a 40.

6. La composición de nanopartículas de la reivindicación 5, en donde la composición comprende:

10 (a) aproximadamente entre un 30 % en moles y aproximadamente entre un 60 % en moles de lípido ionizable, aproximadamente entre un 0.01 % en moles y aproximadamente entre un 30 % en moles de fosfolípido, aproximadamente entre un 18.5 % en moles y aproximadamente entre un 48.5 % en moles de colesterol y derivado de colesterol combinados, y aproximadamente entre un 0 % en moles y aproximadamente entre un 10 % en moles de lípido PEG;

15

(b) aproximadamente entre un 45 % en moles y aproximadamente entre un 65 % en moles de lípidos ionizables, aproximadamente entre un 5 % en moles y aproximadamente entre un 10 % en moles de fosfolípidos, aproximadamente entre un 25 % en moles y aproximadamente entre un 40 % en moles de colesterol y derivados de colesterol combinados, y aproximadamente entre un 0.5 % en moles y aproximadamente entre un 10 % en moles de lípidos PEG; o

20 (c) aproximadamente 50 % en moles de lípido ionizable, aproximadamente 10 % en moles de fosfolípido, aproximadamente 38.5 % en moles de colesterol y derivado de colesterol combinados, y aproximadamente 1.5 % en moles de lípido PEG.

25

7. La composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además un agente terapéutico y/o profiláctico, opcionalmente en donde el agente terapéutico y/o profiláctico es un ácido ribonucleico (ARN);

30 además opcionalmente en donde el ARN se selecciona del grupo que consiste en un ARN interferente pequeño (ARNip), un ARN interferente asimétrico (ARNia), un microARN (ARNmi), un ARN de sustrato Dicer (ARNds), un ARN de horquilla pequeño (ARNhc), un ARN mensajero (ARNm), un ARN largo no codificante (ARNlnc) y mezclas de los mismos;

35 aún más opcionalmente, en donde el ARN es un ARNm.

8. La composición de nanopartículas de la reivindicación 7, en donde:

40 (a) la composición tiene aproximadamente 0.025 mg/mL a aproximadamente 4 mg/mL, aproximadamente 0.025 mg/mL a aproximadamente 0.4 mg/mL, 0.05 mg/mL a aproximadamente 0.2 mg/mL, o 0.05 mg/mL a aproximadamente 0.1 mg/mL del ARN;

(b) la relación peso/peso del componente lipídico con los agentes terapéuticos y/o profilácticos es de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 60:1; y/o

45

(c) la relación molar de átomos de nitrógeno ionizables en los lípidos ionizables a los grupos fosfato en el ARN es de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 30:1.

9. Una composición farmacéutica que comprende la composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un portador farmacéuticamente aceptable.

5 10. La composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, o la composición farmacéutica de la reivindicación 9, para su uso en el tratamiento terapéutico o diagnóstico del cuerpo humano y/o animal en:

(a) un método para administrar un agente terapéutico y/o profiláctico a una célula de mamífero, en donde la célula se pone en contacto con la composición de nanopartículas;

10 (b) un método para administrar específicamente un agente terapéutico y/o profiláctico a un órgano de un mamífero, en donde el órgano de un mamífero se pone en contacto con la composición de nanopartículas; o

15 (c) un método para producir un polipéptido de interés en una célula de mamífero, en donde la célula se pone en contacto con la composición de nanopartículas.

11. La composición de nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto que lo necesita.

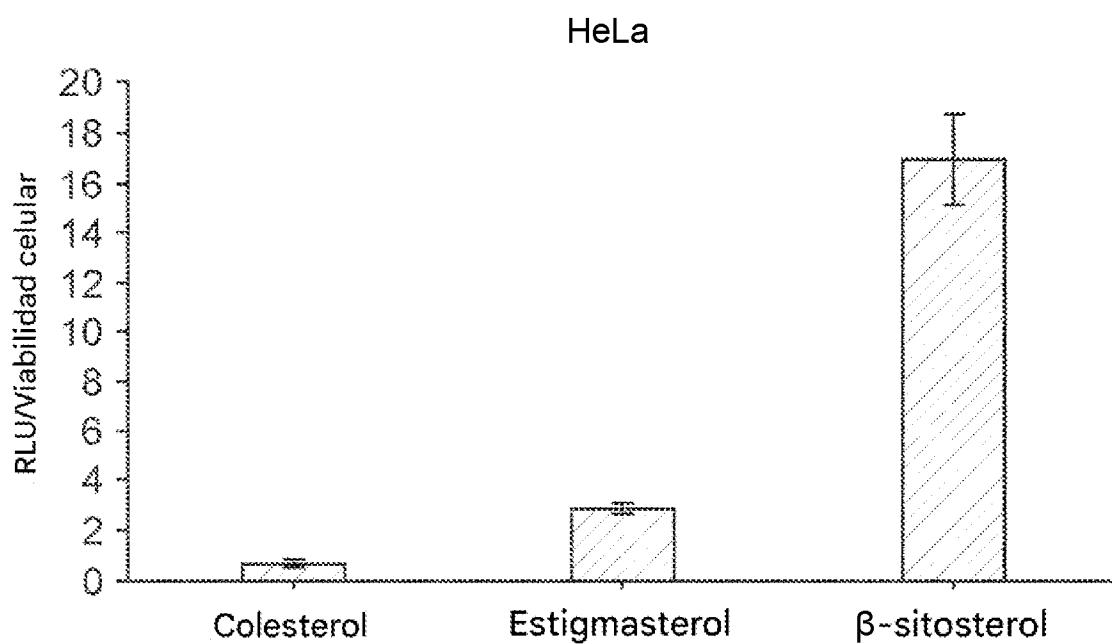
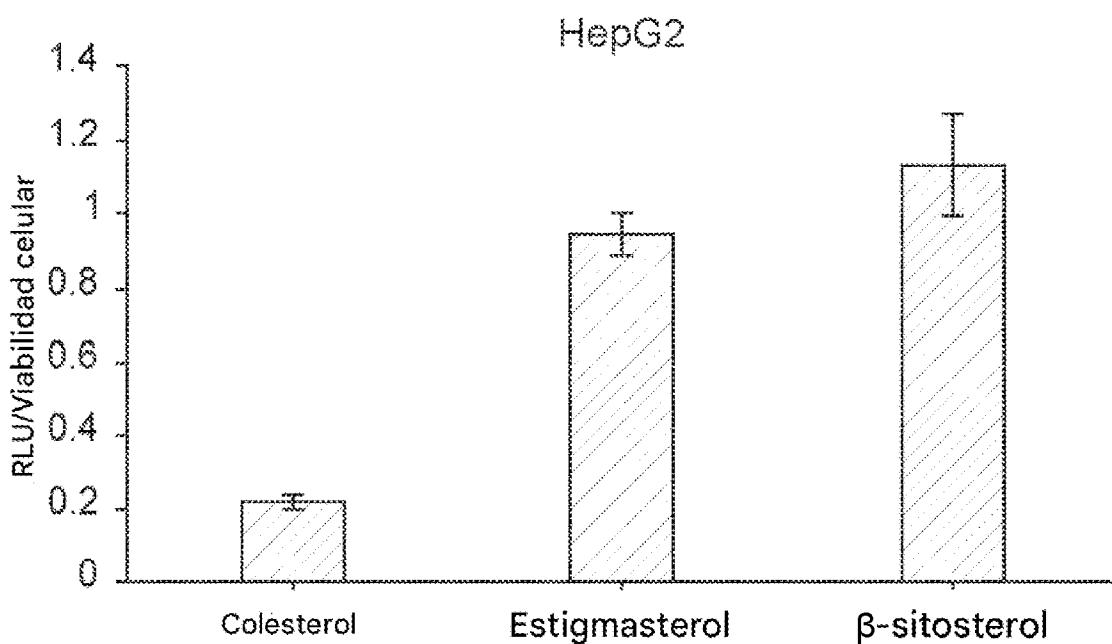
Fig. 1A**Fig. 1B**

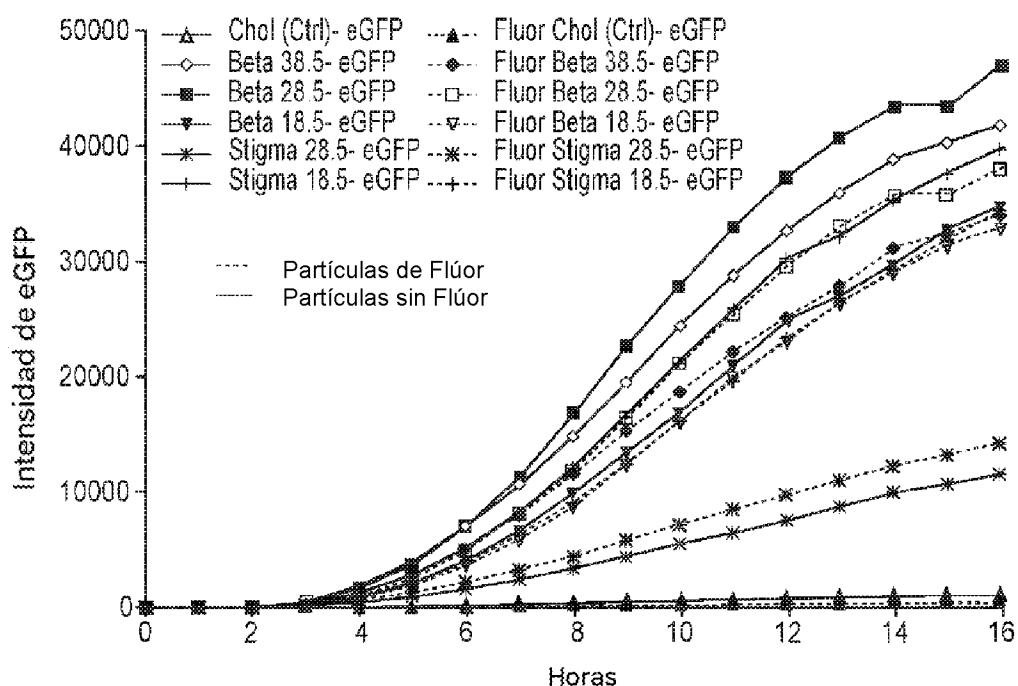
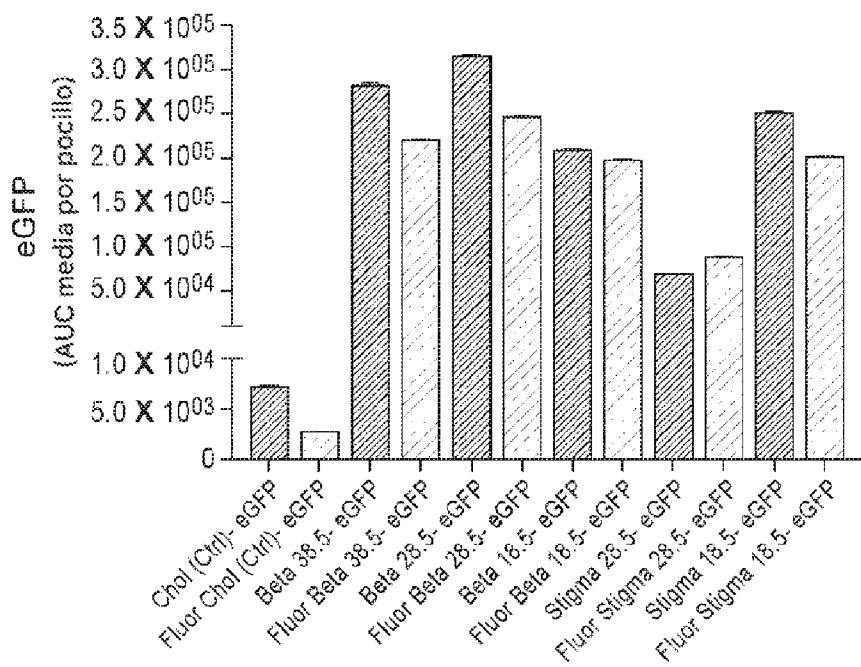
Fig. 2A**Fig. 2B**

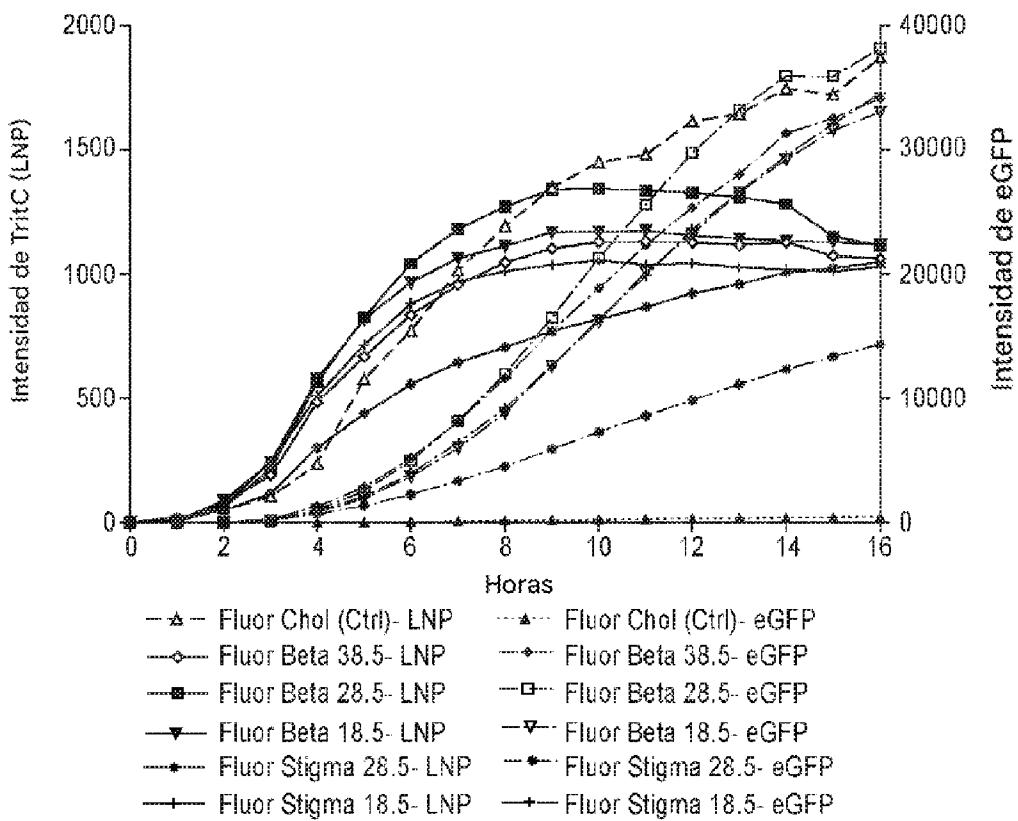
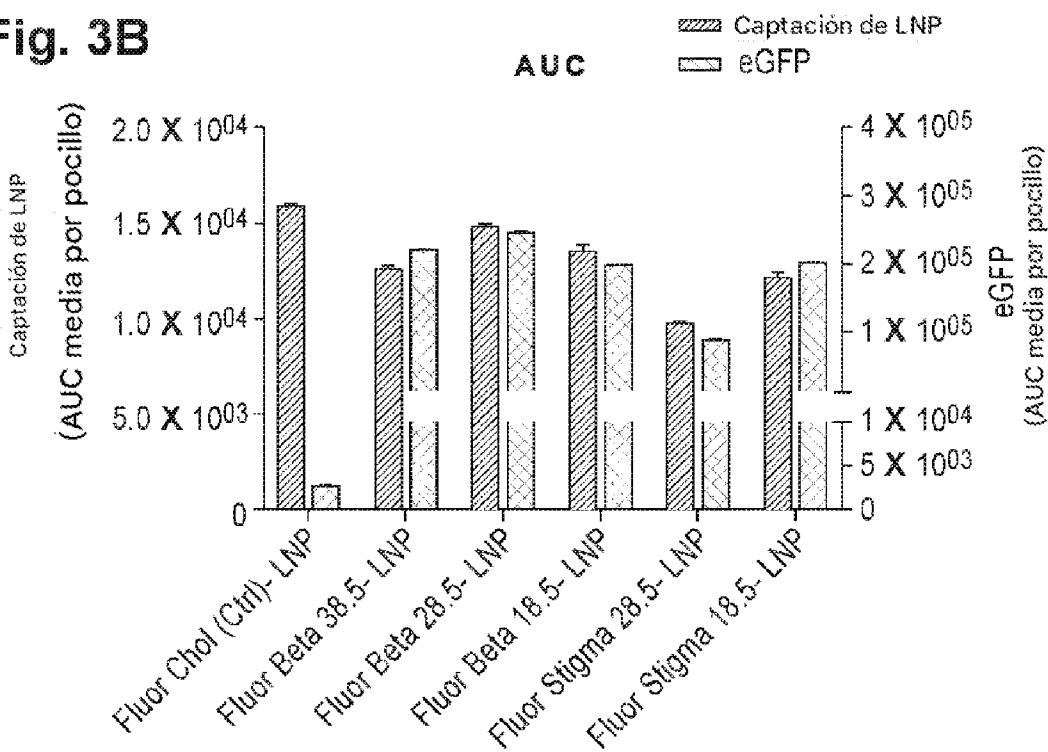
Fig. 3A**Fig. 3B**

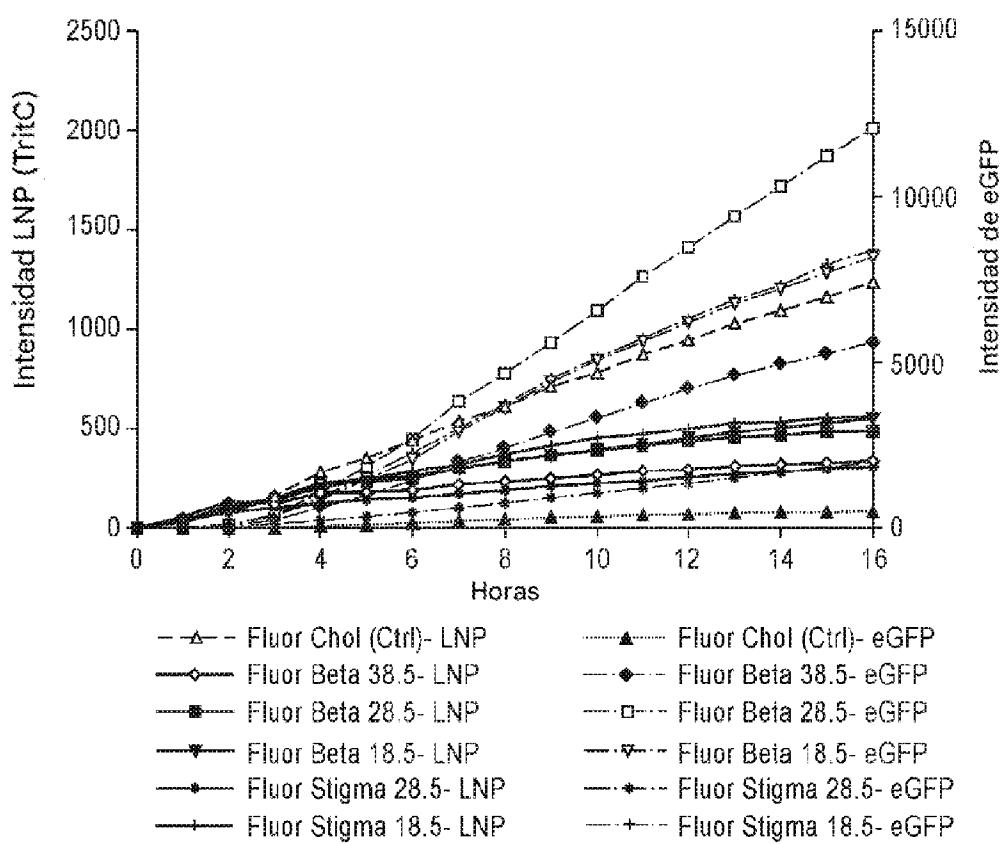
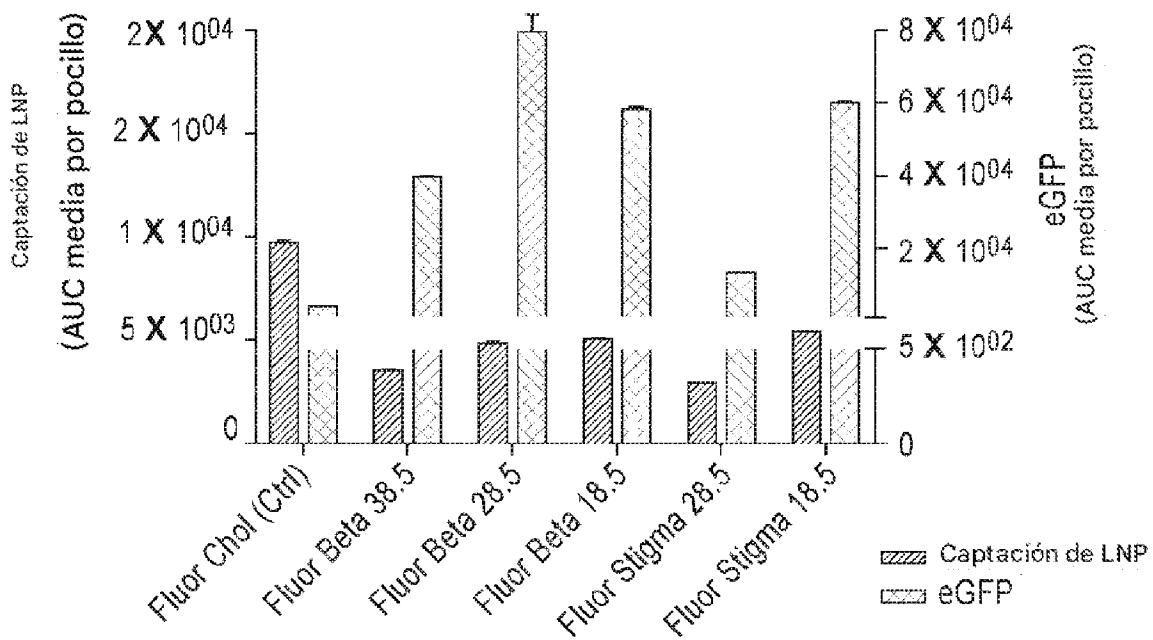
Fig. 4A**Fig. 4B**

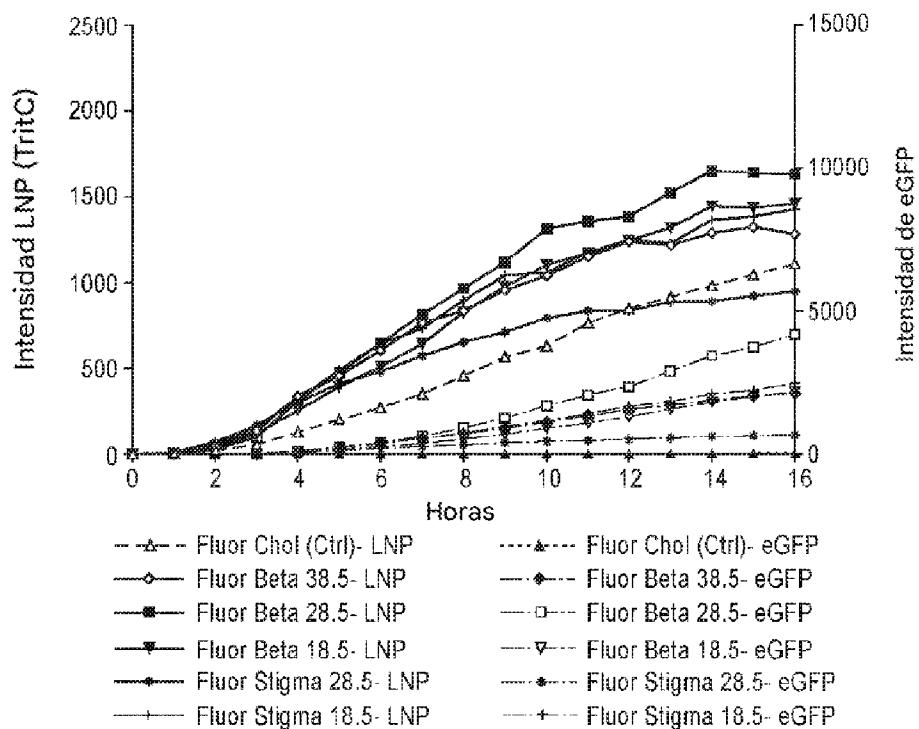
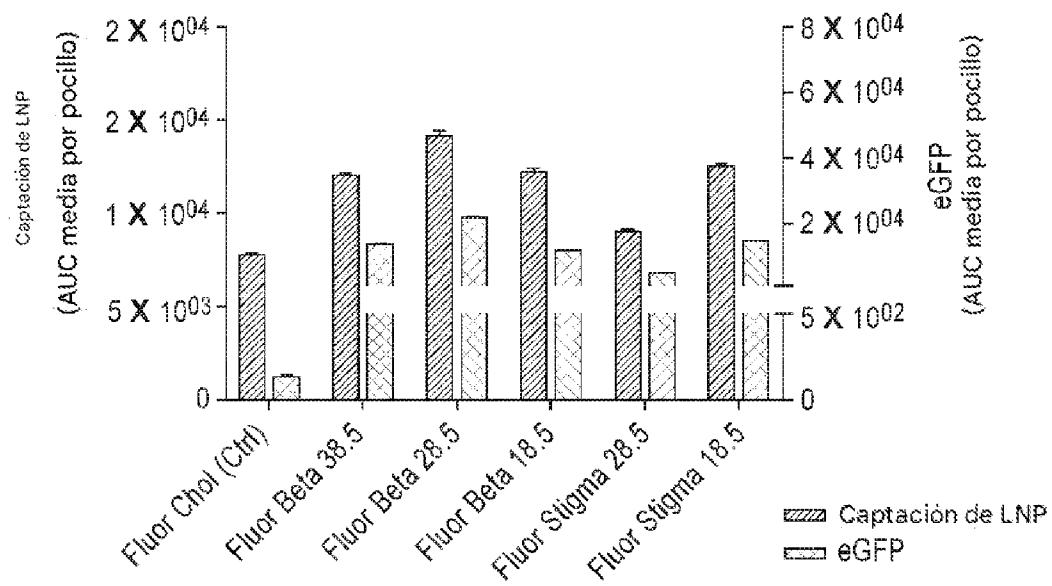
Fig. 5A**Fig. 5B**

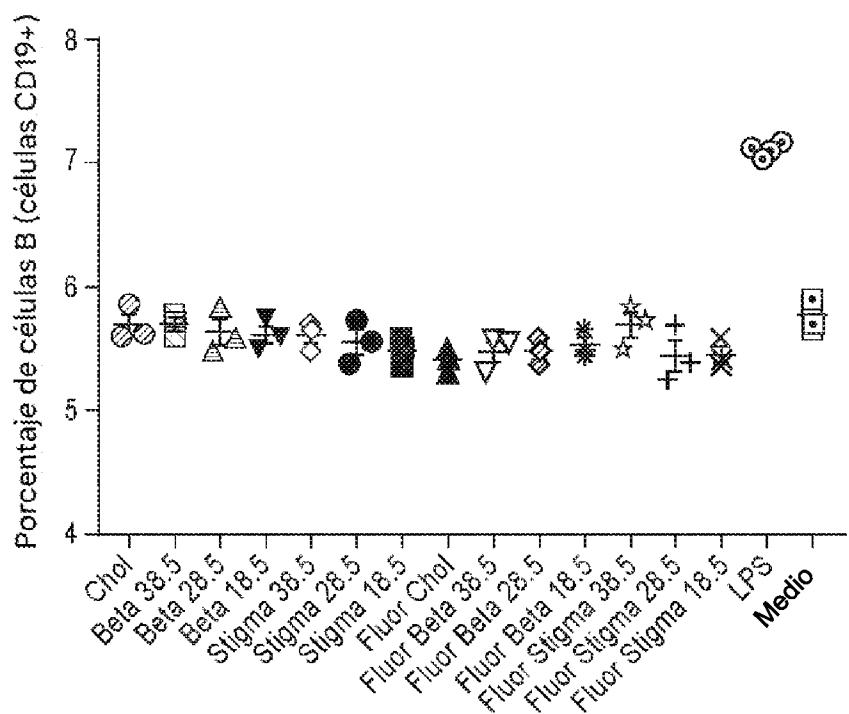
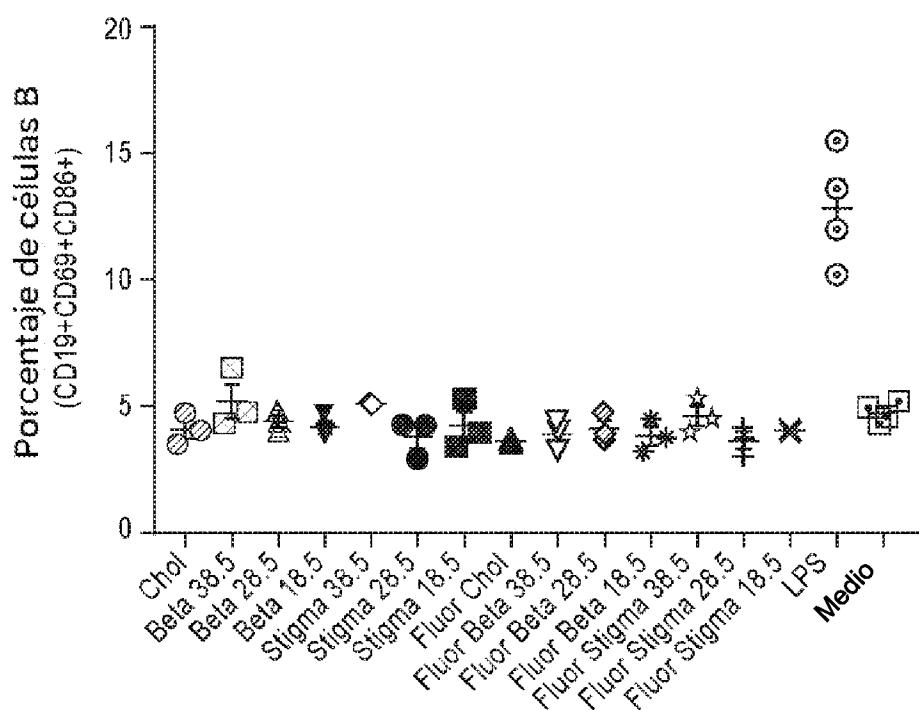
Fig. 6A**Fig. 6B**

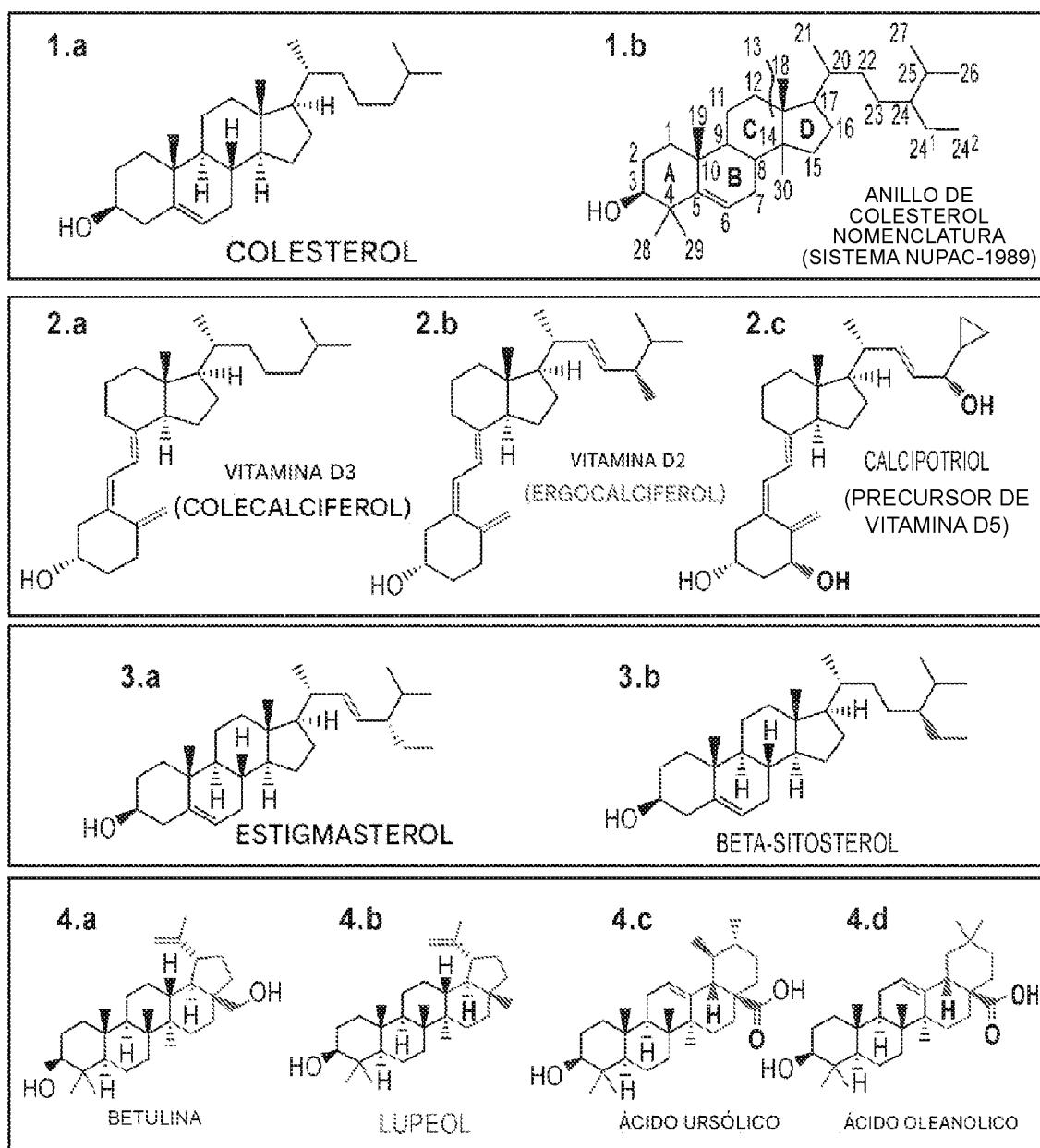
Fig. 7A

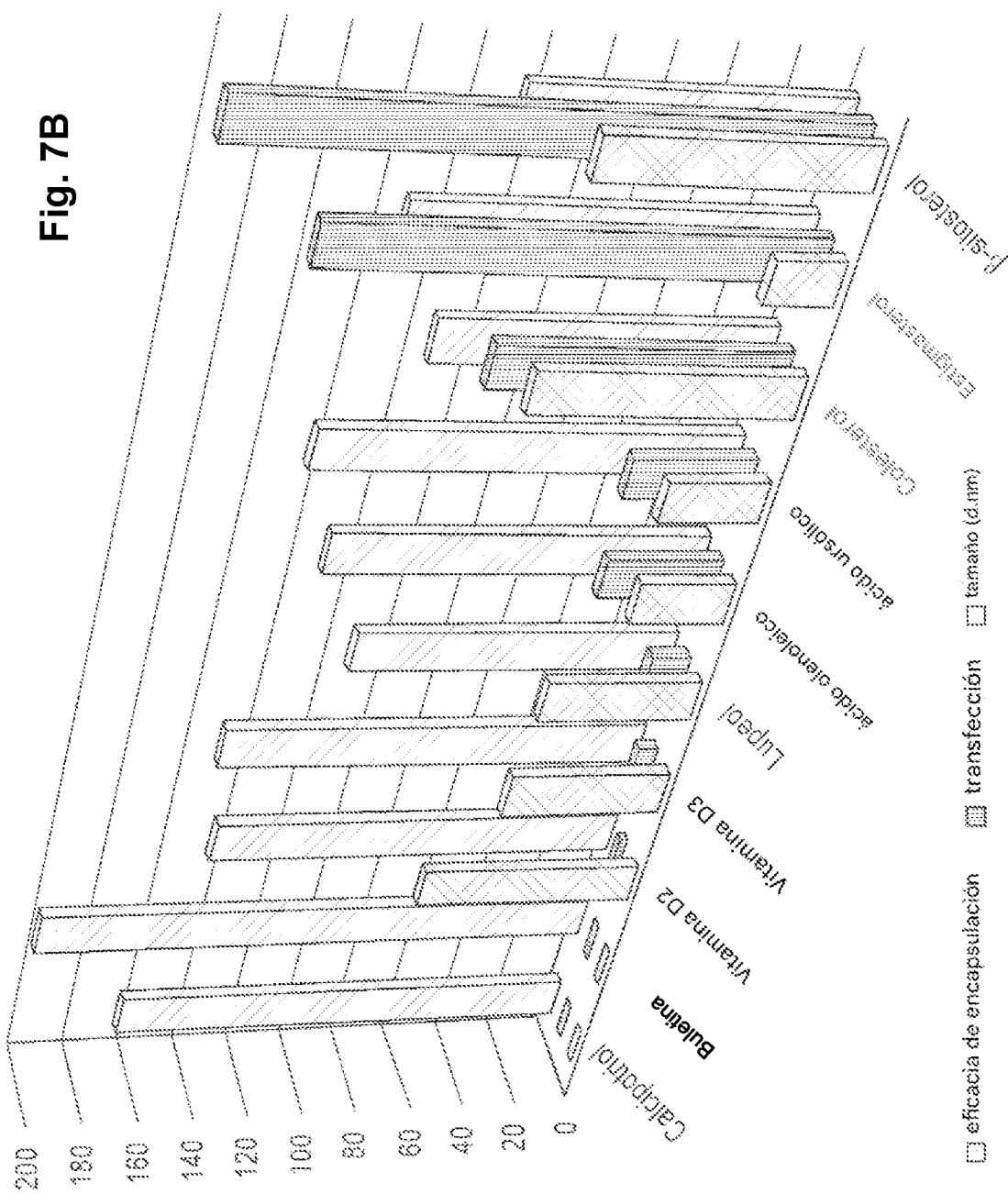
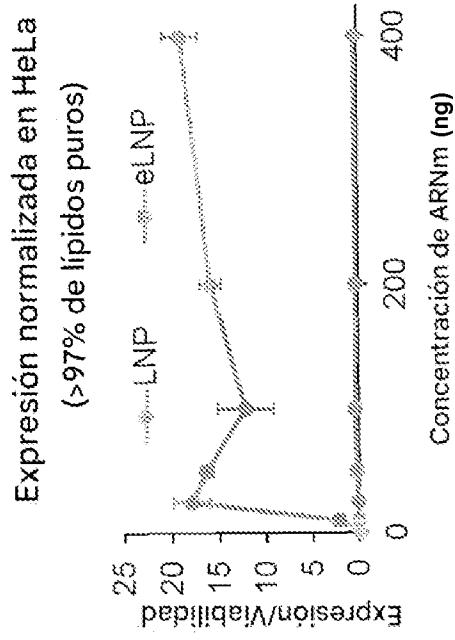
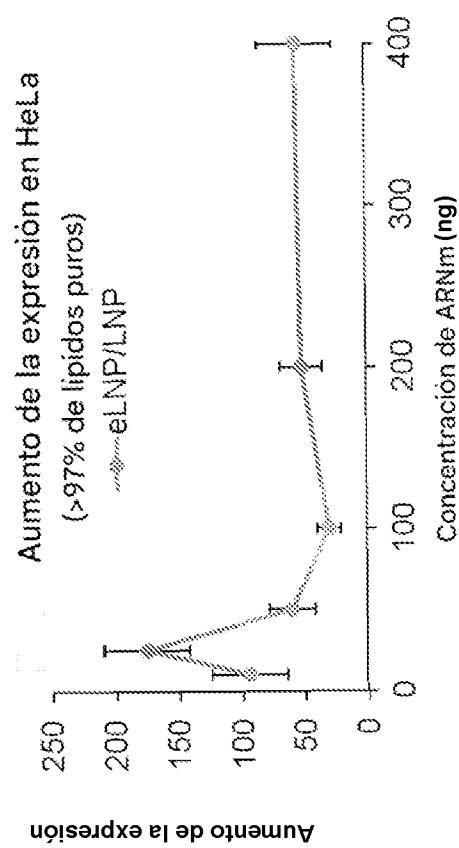
Fig. 7B

Fig. 7C**Fig. 7D**

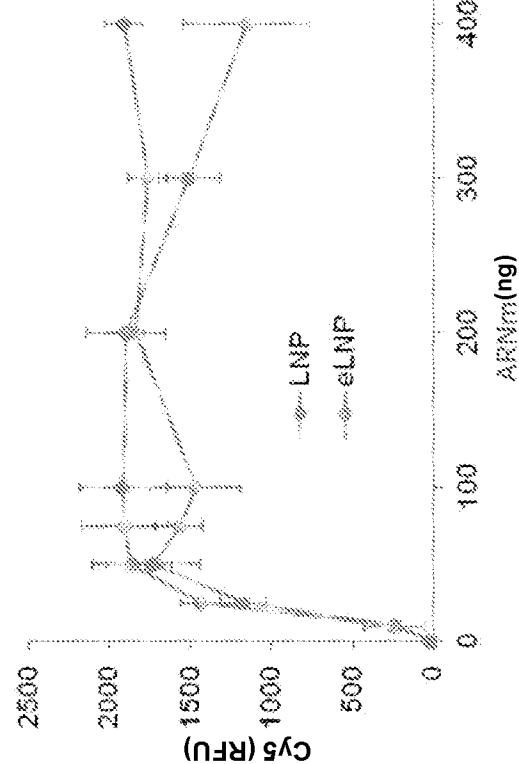
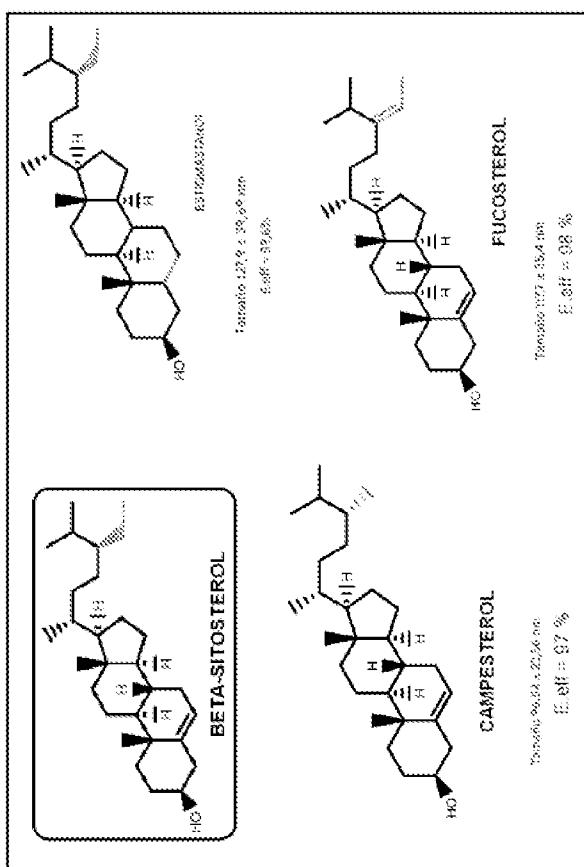
**Fig. 7E****Fig. 7F**

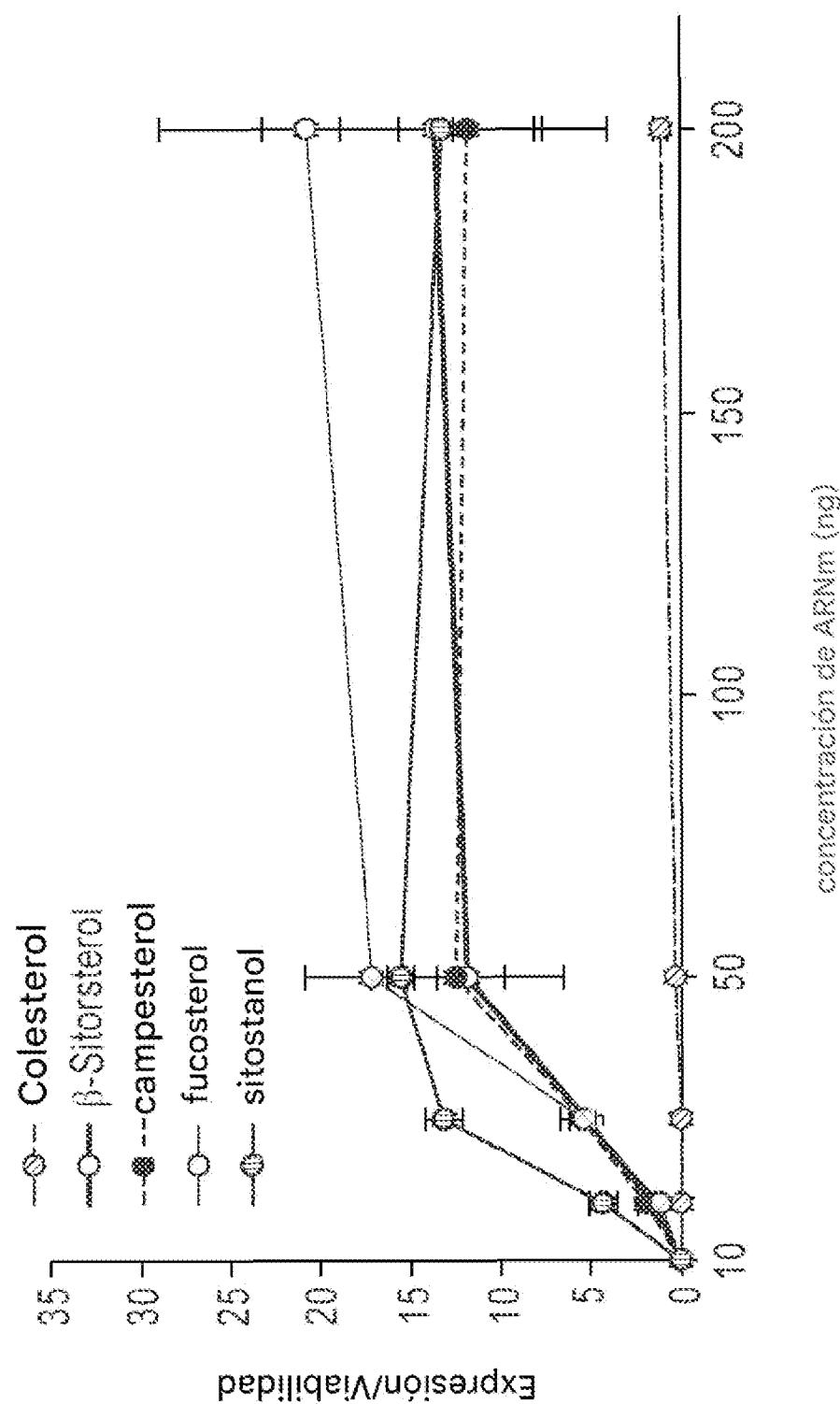
Fig. 7G

Fig. 7H

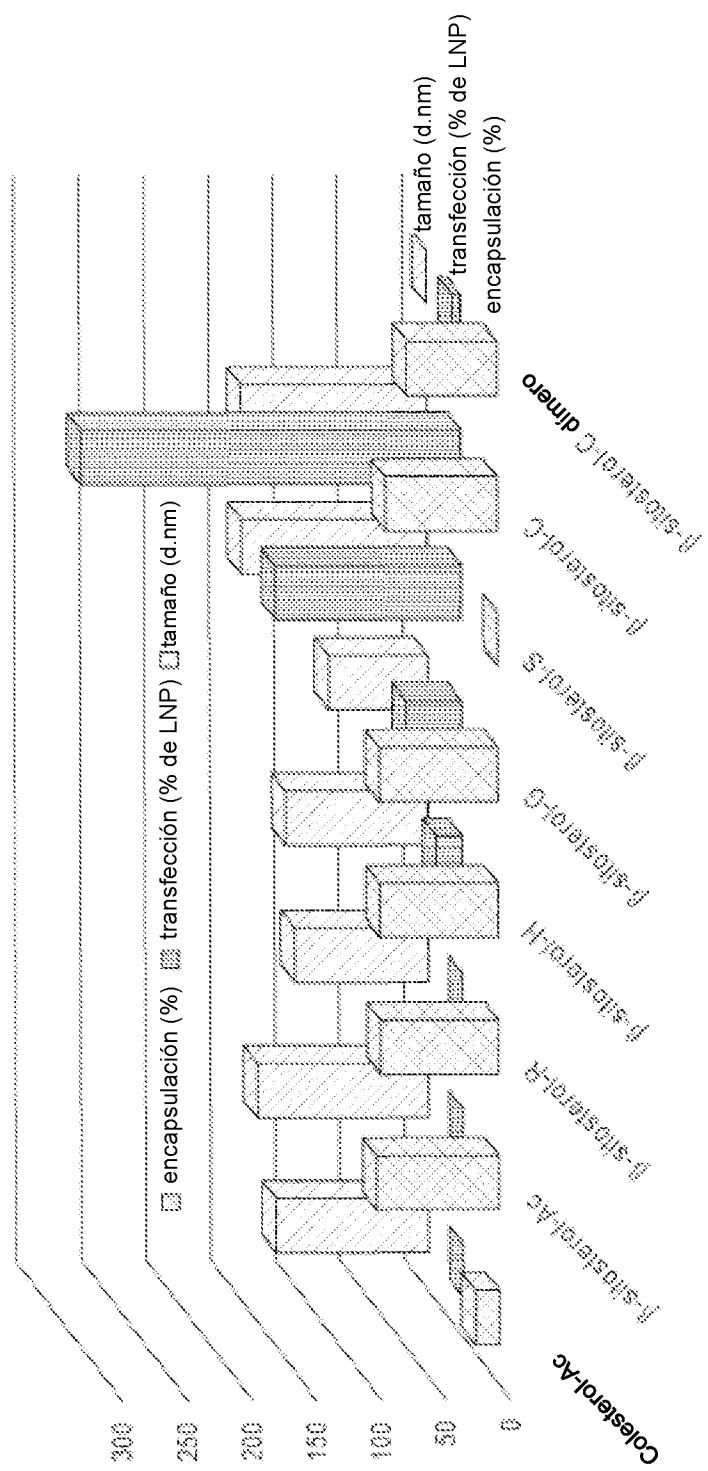


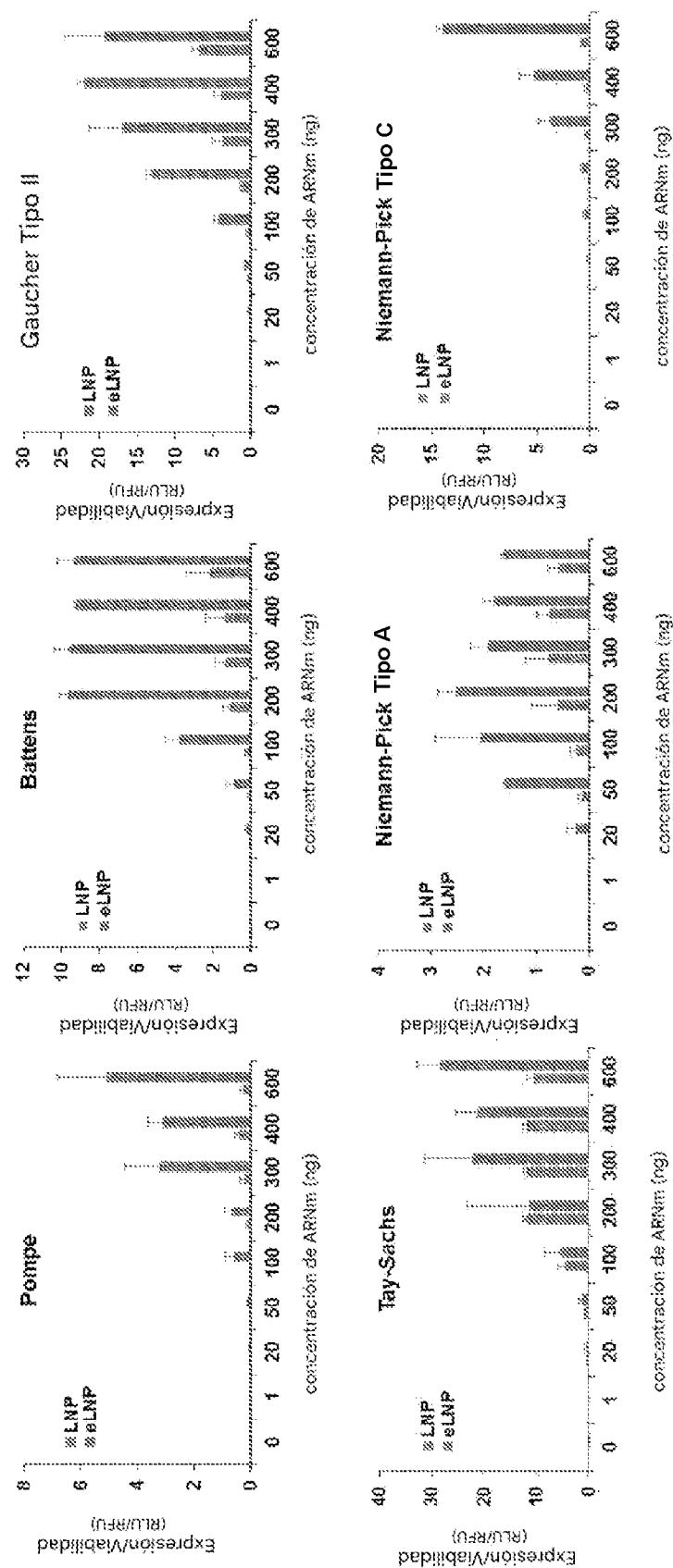
Fig. 8A

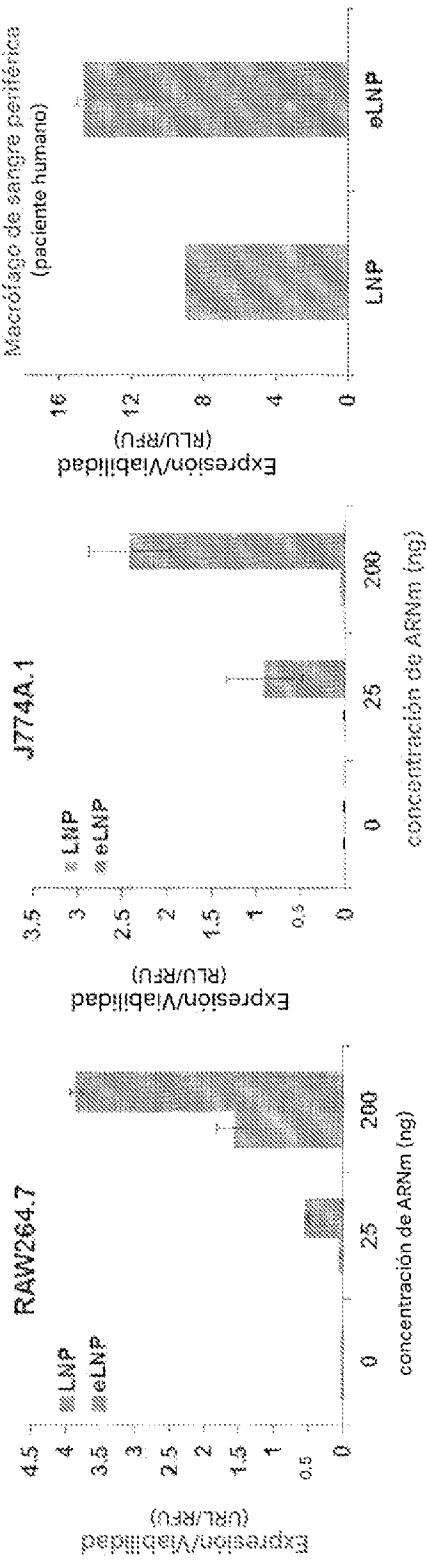
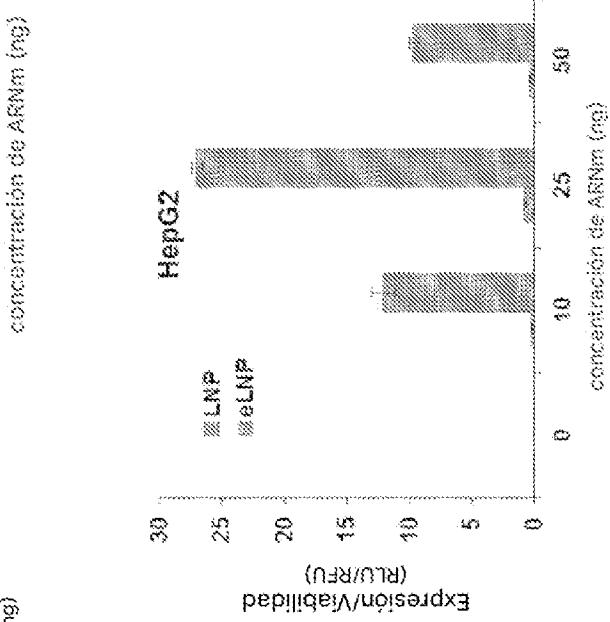
Fig. 8B**Fig. 8C**

Fig. 9A

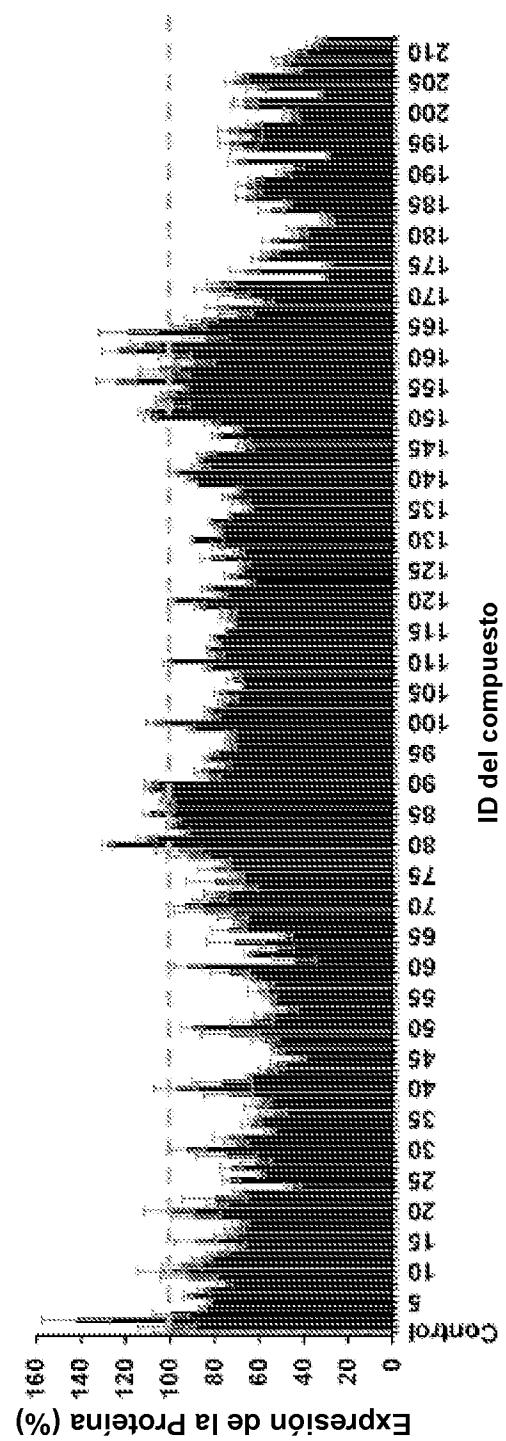


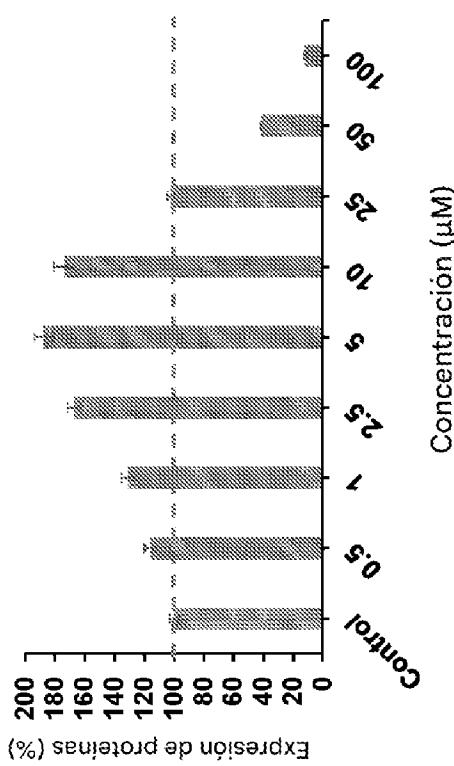
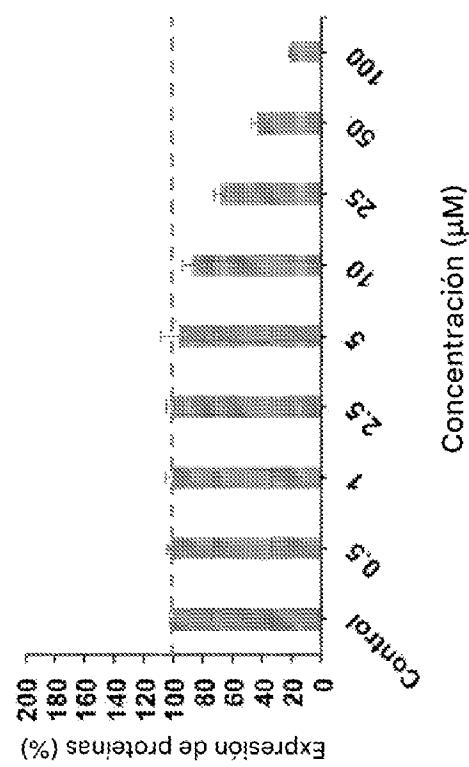
Fig. 9B**Fig. 9C**

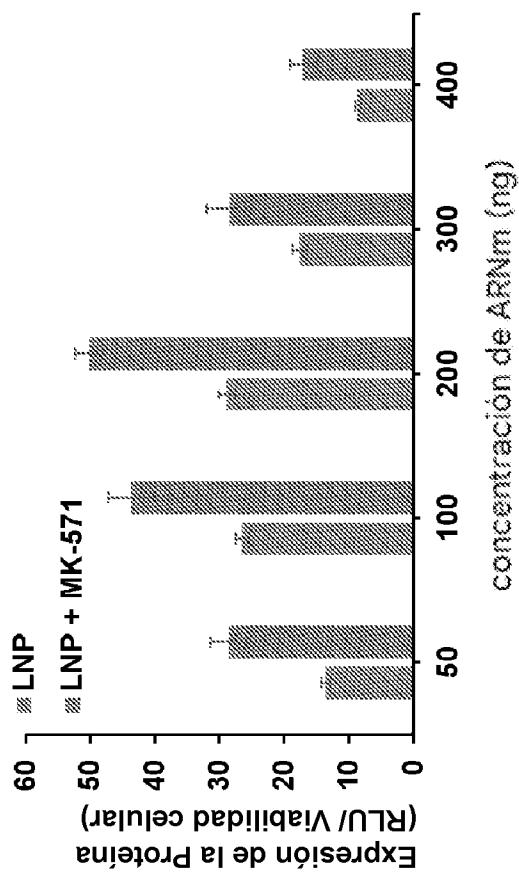
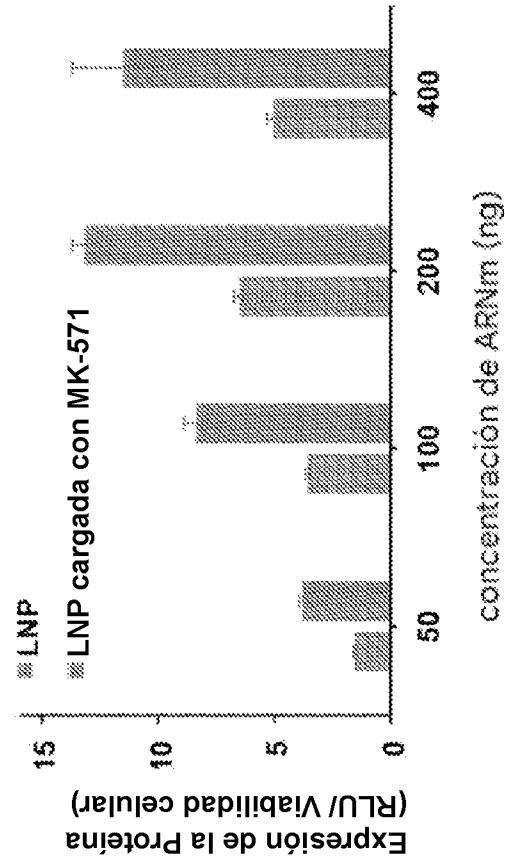
Fig. 9D**Fig. 9E**

Fig. 9F