

Preparación y almacenamiento de formulaciones de ARN liposómico adecuadas para terapia.

Campo técnico

La presente divulgación se refiere a métodos para preparar partículas de ARN lipoplejo para el suministro de ARN a tejidos diana después de la administración parenteral, en particular después de la administración intravenosa, y composiciones que comprenden tales partículas de ARN lipoplejo. La presente divulgación también se refiere a métodos que permiten preparar partículas lipoplejo de ARN de una manera que cumple con las GMP (buenas prácticas de manufactura por sus siglas en inglés) industriales. Además, la presente divulgación se refiere a métodos y composiciones para almacenar partículas de ARN lipoplejo sin pérdida sustancial de la calidad del producto y, en particular, sin pérdida sustancial de actividad de ARN. Las formulaciones de partículas de ARN lipoplejo descritas en este documento pueden congelarse o deshidratarse mediante secado por congelación, secado por atomización o métodos relacionados, lo que permite obtener una vida útil prolongada de los productos en comparación con el almacenamiento líquido. Las partículas lipoplejo de ARN en una modalidad comprenden ARN monocatenario tal como ARNm que codifica un péptido o proteína de interés, tal como un péptido o proteína farmacéuticamente activo. El ARN es captado por células de un tejido diana y el ARN se traduce en el péptido o proteína codificados, que pueden exhibir su actividad fisiológica. El péptido o proteína de interés puede ser un péptido o proteína que comprende uno o más epítopos para inducir o potenciar una respuesta inmune dirigida contra uno o más epítopos. Los métodos y composiciones descritos en este documento son adecuados para su uso de una manera que cumpla con los requisitos para productos farmacéuticos, más específicamente que cumpla con los requisitos de GMP para la fabricación y los requisitos para la calidad de productos farmacéuticos para aplicación parenteral.

Antecedentes

El uso de ARN para la entrega de información genética extraña a las células diana ofrece una alternativa atractiva al ADN. Las ventajas de usar ARN incluyen una expresión transitoria y un carácter no transformador. El ARN no necesita entrar en el núcleo para expresarse y, además, no puede integrarse en el genoma del huésped, eliminando así el riesgo de oncogénesis.

El ARN puede administrarse mediante las denominadas formulaciones lipoplejo, en las que el ARN se une a liposomas compuestos por una mezcla de un lípido catiónico y un lípido auxiliar para formar formulaciones de nanopartículas inyectables. Sin embargo, el desarrollo de

formulaciones para el suministro de ARN biológicamente activo a un tejido diana, incluso después del almacenamiento de las formulaciones, es una necesidad insatisfecha. Además, el desarrollo de métodos para la fabricación de formulaciones de partículas lipoplejo de ARN inyectables que cumplan con las normas GMP donde se proporciona una vida útil prolongada sigue siendo una necesidad insatisfecha.

Por tanto, existe la necesidad de proporcionar formulaciones para el suministro de ARN biológicamente activo a un tejido diana en donde el ARN administrado se traduce eficazmente en el péptido o proteína que codifica. Además, existe la necesidad de proporcionar tales formulaciones que sean estables en almacenamiento sin una pérdida sustancial de la calidad del producto y, en particular, sin una pérdida sustancial de la actividad biológica del ARN.

Los inventores descubrieron sorprendentemente que las formulaciones de partículas de ARN lipoplejo descritas en el presente documento cumplen los requisitos mencionados anteriormente.

Resumen

I.Métodos para preparar partículas de ARN lipoplejo, partículas de ARN lipoplejo y composiciones que comprenden partículas de ARN lipoplejo

En un primer aspecto, la presente divulgación se refiere a métodos para preparar partículas de ARN lipoplejo con actividad biológica mejorada, partículas de ARN lipoplejo preparadas según la divulgación y composiciones que comprenden tales partículas de ARN lipoplejo. Las partículas de ARN lipoplejo y las composiciones que comprenden partículas de ARN lipoplejo son útiles para el suministro de ARN a un tejido diana después de la administración parenteral, en particular después de la administración intravenosa. Las partículas de ARN lipoplejo se preparan utilizando liposomas que se obtienen inyectando una solución altamente concentrada de los lípidos en etanol en agua o una fase acuosa adecuada. En una modalidad, el producto lipoplejo de ARN se caracteriza por un patrón específico en la dispersión de rayos X, donde se observa un solo pico de Bragg a aproximadamente 1 nm^{-1} , donde el ancho del pico es menor que 0.2 nm^{-1} .

En una modalidad, los liposomas y las partículas de ARN lipoplejo comprenden 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA) y 1,2-di-(9Z-octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE). La concentración de DOPE en la mezcla de lípidos es más alta que la solubilidad de equilibrio de DOPE en etanol solo. A temperatura ambiente, el DOPE solo

tiene una solubilidad de aproximadamente 50 mM, junto con el DOTMA tiene una solubilidad de 100 mM o más. Las soluciones de lípidos para formar liposomas, a partir de los cuales se obtienen lipoplejos altamente activos, pueden tener una concentración total de lípidos de 270 mM o superior (por ejemplo, DOPE a 90 mM o superior). Pueden obtenerse soluciones de

5 concentración aún mayor en etanol aumentando la temperatura. Los liposomas obtenidos de soluciones de lípidos donde la concentración de DOPE está por encima de la solubilidad de equilibrio son significativamente mayores que los liposomas de soluciones de lípidos donde la concentración de DOPE está en la solubilidad de equilibrio y por debajo. El tamaño de los liposomas aumenta monótonamente con la concentración en etanol.

10 Los liposomas preparados de acuerdo con la divulgación se pueden usar para preparar partículas lipoplejo de ARN mezclando los liposomas con ARN. En una modalidad, el ARN se incubaba con NaCl antes de mezclarlo con el fin de ajustar una cierta fuerza iónica, que se requiere para aumentar la actividad de los lipoplejos. Los lipoplejos que se forman a partir de estos liposomas más grandes tienen una actividad biológica significativamente mayor, como lo demuestran

15 experimentos *in vitro* y *en vivo*. Estos lipoplejos con mayor actividad pueden ser claramente discriminados de aquellos con menor actividad por ciertos parámetros fisicoquímicos, por ejemplo (i) un ancho de pico más bajo del pico de Bragg y (ii) un perfil de separación diferente en métodos analíticos dispersivos para mediciones de tamaño, como fraccionamiento de campo-flujo. Los lipoplejos con menor actividad son más pequeños en promedio. Además,

20 también tienen un perfil de elución diferente, que probablemente esté relacionado con parámetros como la conformación molecular, la forma y las interacciones con la fase a granel. Por consiguiente, en este aspecto, la divulgación se refiere a un método para producir un coloide liposómico que comprende inyectar una solución lipídica en etanol en una fase acuosa para producir el coloide liposómico, en donde la concentración de al menos uno de los lípidos en la

25 solución lipídica corresponde a o es superior a la solubilidad en equilibrio del al menos un lípido en etanol.

En una modalidad, el método comprende calentar la solución de lípidos para aumentar la concentración de lípidos en la solución de lípidos. En una modalidad, la solución de lípidos se calienta a una temperatura de al menos aproximadamente 40°C, o al menos aproximadamente

30 60 °C.

En una modalidad, la solución de lípidos es una solución de una mezcla de dos o más lípidos diferentes.

En una modalidad, la concentración de un lípido en la solución de lípidos corresponde a o es más alta que la solubilidad en equilibrio del lípido en etanol.

En una modalidad, la concentración total de lípidos en la solución de lípidos es de aproximadamente 180 mM a aproximadamente 600 mM, de aproximadamente 300 mM a
5 aproximadamente 600 mM, o aproximadamente 330 mM.

En una modalidad, la solución lipídica comprende al menos un lípido catiónico y al menos un lípido adicional.

En una modalidad, la concentración de un lípido adicional en la solución de lípidos corresponde a o es mayor que la solubilidad en equilibrio del lípido adicional en etanol.

10 En una modalidad, el al menos un lípido catiónico comprende 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA) y/o 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP).

En una modalidad, el al menos un lípido adicional comprende 1,2-di-(9Z-octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), colesterol (Chol) y/o 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC).

15 En una modalidad, el al menos un lípido catiónico comprende 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA) y el al menos un lípido adicional comprende 1,2-di-(9Z-octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE).

En una modalidad, la relación molar del al menos un lípido catiónico al al menos un lípido adicional es de aproximadamente 10:0 a aproximadamente 1:9, de aproximadamente 4:1 a
20 aproximadamente 1:2, de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:1, o aproximadamente 2:1.

En una modalidad, la solución de lípidos comprende DOTMA y DOPE en una relación molar de aproximadamente 10:0 a aproximadamente 1:9, de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2, de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:1, o aproximadamente
25 2:1.

En una modalidad, la concentración de DOPE en la solución de lípidos es al menos aproximadamente 60 mM, o al menos aproximadamente 90 mM.

En una modalidad, la solución de lípidos se inyecta en la fase acuosa a una velocidad de agitación de la fase acuosa de aproximadamente 50 rpm a aproximadamente 150 rpm.

30 En una modalidad, la fase acuosa es agua.

En una modalidad, la fase acuosa tiene un pH ácido. En una modalidad, la fase acuosa comprende ácido acético, por ejemplo, en una cantidad de aproximadamente 5 mM.

En una modalidad, el método comprende además agitar el coloide liposómico.

En una modalidad, el coloide de liposomas se agita durante aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 60 minutos, o durante aproximadamente 30 minutos.

La divulgación se refiere además a un método para producir un coloide liposómico que comprende inyectar una solución lipídica que comprende DOTMA y DOPE en una relación molar de aproximadamente 2:1 en etanol en agua agitada a una velocidad de agitación de aproximadamente 150 rpm para producir el coloide liposómico, en donde la concentración de DOTMA y DOPE en la solución de lípidos es de aproximadamente 330 mM.

En una modalidad, el método de producción de un liposoma no comprende la etapa de extrusión de los liposomas.

La divulgación se refiere además a un coloide de liposoma que se puede obtener mediante el método de producción de un liposoma.

En una modalidad, los liposomas tienen un diámetro medio de al menos aproximadamente 250 nm.

En una modalidad, los liposomas tienen un diámetro medio que oscila entre 250 nm a aproximadamente 800 nm.

En una modalidad, los liposomas tienen un índice de polidispersidad menor de aproximadamente 0.5, menor de aproximadamente 0.4 o menor de aproximadamente 0.3.

En una modalidad, los liposomas son liposomas catiónicos.

En una modalidad, los liposomas comprenden al menos un lípido catiónico y al menos un lípido adicional.

En una modalidad, el al menos un lípido catiónico comprende 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA) y/o 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP).

En una modalidad, el al menos un lípido adicional comprende 1,2-di-(9Z-octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), colesterol (Chol) y/o 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC).

En una modalidad, el al menos un lípido catiónico comprende 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA) y el al menos un lípido adicional comprende 1,2-di-(9Z-octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE).

En una modalidad, la relación molar del al menos un lípido catiónico al al menos un lípido adicional es de aproximadamente 10:0 a aproximadamente 1:9, de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2, de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:1, o aproximadamente 2:1.

En una modalidad, los liposomas comprenden DOTMA y DOPE en una relación molar de aproximadamente 10:0 a aproximadamente 1:9, de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2, de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:1, o aproximadamente 2:1.

La divulgación se refiere además a un método para preparar partículas lipoplejo de ARN que comprende añadir el coloide liposómico anterior a una solución que comprende ARN.

En una modalidad, en un patrón de dispersión de rayos X, los lipoplejos de ARN se caracterizan por un solo pico de Bragg a aproximadamente 1 nm^{-1} , donde el ancho del pico es menor que 0.2 nm^{-1} .

En una modalidad, las partículas de ARN lipoplejo tienen un diámetro medio que oscila entre 200 a aproximadamente 800 nm, desde aproximadamente 250 hasta aproximadamente 700 nm, desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 600 nm, desde aproximadamente 300 nm hasta aproximadamente 500 nm, o desde aproximadamente 350 nm hasta aproximadamente 400 nm.

La divulgación se refiere además a una composición que comprende partículas de ARN lipoplejo que se pueden obtener como se describió anteriormente.

En una modalidad, las partículas lipoplejo de ARN comprenden al menos un lípido catiónico y al menos un lípido adicional.

En una modalidad, el ARN codifica un péptido o proteína que comprende al menos un epítipo, en donde la relación de cargas positivas a cargas negativas en las partículas de ARN lipoplejo es de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1.9:2, o aproximadamente 1.3:2.0.

La divulgación se refiere además a una composición que comprende:

Partículas de ARN lipoplejo que comprenden:

ARN que codifica un péptido o proteína que comprende al menos un epítipo, y al menos un lípido catiónico y al menos un lípido adicional,

donde la relación de cargas positivas a cargas negativas en las partículas lipoplejo de ARN es de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1.9:2, o aproximadamente 1.3:2.0 y

donde las partículas de ARN lipoplejo se caracterizan por un solo pico de Bragg a aproximadamente 1 nm^{-1} , donde el ancho del pico es menor que 0.2 nm^{-1} .

En una modalidad, la composición comprende además cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 45 mM a aproximadamente 300 mM, desde aproximadamente 10 mM hasta aproximadamente 50 mM, o desde aproximadamente 80 mM hasta aproximadamente 150 mM.

En una modalidad, la composición comprende además un tampón.

En una modalidad, la composición comprende además un agente quelante.

En una modalidad, las partículas de ARN lipoplejo descritas en este aspecto en I. tienen un diámetro promedio que varía de aproximadamente 200 a aproximadamente 800 nm, desde aproximadamente 250 hasta aproximadamente 700 nm, desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 600 nm, desde aproximadamente 300 nm hasta aproximadamente 500 nm, o desde aproximadamente 350 nm hasta aproximadamente 400 nm.

En una modalidad, las partículas de ARN lipoplejo tienen un índice de polidispersidad menor de aproximadamente 0.5, menor de aproximadamente 0.4 o menor de aproximadamente 0.3.

En una modalidad, el al menos un lípido catiónico comprende 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA) y/o 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP).

En una modalidad, los al menos un lípido adicional comprende 1,2-di-(9Z-octadecenoil)-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina (DOPE), colesterol (Chol) y/o 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina (DOPC).

En una modalidad, el al menos un lípido catiónico comprende 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA) y el al menos un lípido adicional comprende 1,2-di-(9Z-octadecenoil)-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina (DOPE).

En una modalidad, la relación molar del al menos un lípido catiónico al al menos un lípido adicional es de aproximadamente 10:0 a aproximadamente 1:9, de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2, de aproximadamente de 3:1 a aproximadamente 1:1, o aproximadamente 2:1.

En una modalidad, las partículas de ARN lipoplejo comprenden DOTMA y DOPE en una relación molar de aproximadamente 10:0 a 1:9, de aproximadamente 4:1 a 1:2, de aproximadamente de 3:1 a aproximadamente 1:1, o aproximadamente 2:1 y en donde la relación de carga de las cargas positivas en DOTMA a las cargas negativas en el ARN es de aproximadamente 1:2 a 1.9:2.

En una modalidad, el agente quelante es ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

En una modalidad, el EDTA está en una concentración de aproximadamente 0.25 mM a aproximadamente 5 mM, o de aproximadamente 2.5 mM.

En una modalidad, la composición comprende además un adyuvante.

En una modalidad, la composición está formulada para administración sistémica.

En una modalidad, la administración sistémica es por vía intravenosa.

La divulgación se refiere además a una composición como se describe para uso terapéutico.

II. Métodos para preparar partículas lipoplejo de ARN de una manera que cumpla con las GMP industriales

En un segundo aspecto, la presente divulgación se refiere a métodos que permiten preparar partículas de ARN lipoplejo de una manera que cumple con las GMP industriales.

- 5 En una modalidad de la divulgación, se usa un sistema de rutas de fluidos para la fabricación GMP del producto farmacéutico de partículas lipoplejo de ARN, que permite un control preciso de la proporción de mezcla de ARN a liposomas, lo cual es importante para la calidad del producto. En una modalidad, la ruta del fluido comprende la mezcla de una solución de liposomas y una solución de ARN en una forma de 1 a 1 (volumen/volumen), donde las
- 10 concentraciones de los componentes se seleccionan para mantener exactamente la relación de carga deseada. En una modalidad, el ARN se incubaba con NaCl antes de mezclarlo para ajustar una cierta fuerza iónica, que se requiere para la actividad de los lipoplejos. En una modalidad, se realiza una configuración de mezcla de tipo Y, que se basa completamente en materiales de un solo uso. La dinámica de fluidos está optimizada para mantener las características de las
- 15 partículas y evitar obstrucciones. Por el contrario, cuando se utilizan dispositivos de microfluidos disponibles comercialmente, la obstrucción se produce después de algún tiempo, lo que imposibilita la aplicación de las GMP.

- En una modalidad, los lipoplejos se fabrican incubando ARN con liposomas catiónicos, donde la proporción de mezcla y las condiciones de mezcla se controlan exactamente mediante el uso
- 20 de una bomba de jeringa (bomba perfusora), donde dos jeringas, una que comprende liposomas y otra que comprende ARN se insertan en bombas de jeringa, preferentemente en paralelo en la misma bomba. Los pistones de ambas bombas son movidos hacia adelante por el mismo impulsor, controlando así exactamente los volúmenes relativos que se mezclan. En las condiciones de proceso seleccionadas, se utilizan jeringas idénticas para ambas soluciones, lo
- 25 que permite una condición de mezcla exacta uno a uno (v/v). Ajustando las concentraciones de las dos soluciones antes de la mezcla, la relación entre el ARN y los liposomas (lípidos catiónicos) se controla con exactitud.

- Por consiguiente, en este aspecto, la divulgación se refiere a un método para la fabricación de flujo continuo de partículas lipoplejo de ARN que comprende mezclar una solución que
- 30 comprende ARN y una solución que comprende liposomas catiónicos en condiciones de mezcla controladas del ARN y los liposomas catiónicos.

En una modalidad, la solución que comprende liposomas catiónicos es el coloide de liposomas como se describió anteriormente.

En una modalidad, la solución que comprende ARN y la solución que comprende liposomas catiónicos son soluciones acuosas.

En una modalidad, se usa un caudal que permite mezclar la solución que comprende ARN y la solución que comprende liposomas catiónicos.

- 5 En una modalidad, el flujo se caracteriza por un número de Reynolds superior a 300, o de aproximadamente 500 a aproximadamente 2100.

En una modalidad, las condiciones de mezcla controladas comprenden controlar la proporción de mezcla de la solución que comprende ARN y la solución que comprende liposomas catiónicos.

- 10 En una modalidad, las condiciones de mezcla controlada comprenden controlar el volumen relativo de la solución que comprende ARN y la solución que comprende liposomas catiónicos que se van a mezclar.

En una modalidad, la proporción de mezcla del ARN y los liposomas catiónicos se controla usando un volumen de mezcla idéntico (v/v) de la solución que comprende ARN y la solución

- 15 que comprende liposomas catiónicos y ajustando las concentraciones de ARN y liposomas catiónicos en las respectivas soluciones.

En una modalidad, las condiciones de mezcla controladas se seleccionan para mantener las características de las partículas lipoplejo de ARN mientras se evita la obstrucción.

En una modalidad, el método comprende usar un elemento de mezcla de tipo Y o de tipo T.

- 20 En una modalidad, el elemento de mezcla de tipo Y o tipo T tiene un diámetro de aproximadamente 1.2 mm a aproximadamente 50 mm.

En una modalidad, el método comprende el uso de un elemento de mezcla, por ejemplo, un elemento de mezcla de tipo Y o T, en donde los fluidos de dos tubos o mangueras se juntan y en donde no hay elementos de mezcla estáticos internos como, por ejemplo, dividir y

25 recombinar, espina de pescado escalonada, canales en zigzag o retorcidos, o serpentinas tridimensionales están presentes. Los elementos de mezcla pueden tener diámetros entre 1.2 y 50.0 mm.

En una modalidad, el método comprende usar un dispositivo, donde dos jeringas, una que comprende la solución que comprende liposomas catiónicos y otra que comprende la solución

30 que comprende ARN se insertan en paralelo en el mismo o dos soportes y los pistones del dispositivo sobresalen por uno o dos actuador(es) de precisión. En una modalidad, el método comprende usar una bomba de jeringa, donde dos jeringas, una que comprende la solución que

comprende liposomas catiónicos y otra que comprende la solución que comprende ARN se insertan en paralelo en la misma bomba.

En una modalidad, el método comprende el uso de un recipiente presurizado, una bomba de membrana, una bomba de engranajes, una bomba de levitación magnética, una bomba peristáltica, bombas HPLC/FPLC o cualquier otra bomba de pistón, opcionalmente en combinación con sensores de caudal opcionalmente con retroalimentación. bucle para control en línea y ajuste en tiempo real del caudal.

En una modalidad, la mezcla de la solución que comprende ARN y la solución que comprende liposomas comprende cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 45 mM a aproximadamente 300 mM, o comprende una fuerza iónica correspondiente al cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 45 mM a aproximadamente 300 mM.

En una modalidad, la solución de ARN comprende cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 90 mM a aproximadamente 600 mM, o comprende una fuerza iónica correspondiente al cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 90 mM a aproximadamente 600 mM.

En una modalidad, la mezcla de la solución que comprende ARN y la solución que comprende liposomas tiene una fuerza iónica de al menos aproximadamente 50 mM.

En una modalidad, en un patrón de dispersión de rayos X, los lipoplejos de ARN se caracterizan por un solo pico de Bragg a aproximadamente 1 nm^{-1} , donde el ancho del pico es menor que 0.2 nm^{-1} .

En una modalidad, las partículas de ARN lipoplejo tienen un diámetro medio que oscila entre 200 a aproximadamente 800 nm, desde aproximadamente 250 hasta aproximadamente 700 nm, desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 600 nm, desde aproximadamente 300 nm hasta aproximadamente 500 nm, o desde aproximadamente 350 nm hasta aproximadamente 400 nm.

La divulgación se refiere además a una composición que comprende partículas de ARN lipoplejo que se pueden obtener como se describió anteriormente.

En una modalidad, las partículas lipoplejo de ARN comprenden al menos un lípido catiónico y al menos un lípido adicional.

En una modalidad, el ARN codifica un péptido o proteína que comprende al menos un epítipo, en donde la relación de cargas positivas a cargas negativas en las partículas de ARN lipoplejo es de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1.9:2, o aproximadamente 1.3:2.0.

La divulgación se refiere además a una composición que comprende:

Partículas de ARN lipoplejo que comprenden:

ARN que codifica un péptido o proteína que comprende al menos un epítipo, y
al menos un lípido catiónico y al menos un lípido adicional,

donde la relación de cargas positivas a cargas negativas en las partículas lipoplejo de

5 ARN es de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1.9:2, o aproximadamente 1.3:2.0 y

donde las partículas de ARN lipoplejo se caracterizan por un solo pico de Bragg a
aproximadamente 1 nm^{-1} , donde el ancho del pico es menor que 0.2 nm^{-1} .

En una modalidad, la composición comprende además cloruro de sodio en una concentración
de aproximadamente 10 a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 45 mM a
10 aproximadamente 300 mM, desde aproximadamente 10 mM hasta aproximadamente 50 mM,
o desde aproximadamente 80 mM hasta aproximadamente 150 mM.

En una modalidad, la composición comprende además un tampón.

En una modalidad, la composición comprende además un agente quelante.

En una modalidad, las partículas de ARN lipoplejo descritas en este aspecto en II. tienen un
15 diámetro medio que oscila entre 200 a aproximadamente 800 nm, desde aproximadamente 250
hasta aproximadamente 700 nm, desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 600 nm,
desde aproximadamente 300 nm hasta aproximadamente 500 nm, o desde aproximadamente
350 nm hasta aproximadamente 400 nm.

En una modalidad, las partículas de ARN lipoplejo tienen un índice de polidispersidad menor
20 de aproximadamente 0.5, menor de aproximadamente 0.4 o menor de aproximadamente 0.3.

En una modalidad, el al menos un lípido catiónico comprende 1.2-di-O-octadecenil-3-
trimetilamonio propano (DOTMA) y/o 1.2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP).

En una modalidad, los al menos un lípido adicional comprende 1.2-di-(9Z-octadecenoil)-sn-
glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), colesterol (Chol) y/o 1.2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
25 (DOPC).

En una modalidad, los al menos un lípido catiónico comprende 1.2-di-O-octadecenil-3-
trimetilamonio propano (DOTMA) y el al menos un lípido adicional comprende 1.2-di-(9Z-
octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE).

En una modalidad, la relación molar del al menos un lípido catiónico al al menos un lípido
30 adicional es de aproximadamente 10:0 a aproximadamente 1:9, de aproximadamente 4:1 a
aproximadamente 1:2, de aproximadamente de 3:1 a aproximadamente 1:1, o aproximadamente
2:1.

En una modalidad, los Partículas de ARN lipoplejo comprenden DOTMA y DOPE en una relación molar de aproximadamente 10:0 a 1:9, de aproximadamente 4:1 a 1:2, de aproximadamente de 3:1 a aproximadamente 1:1, o aproximadamente 2:1 y en donde la relación de carga de las cargas positivas en DOTMA a las cargas negativas en el ARN es de aproximadamente 1:2 a 1.9:2.

En una modalidad, el agente quelante es ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

En una modalidad, el EDTA está en una concentración de aproximadamente 0.25 mM a aproximadamente 5 mM, o de aproximadamente 2.5 mM.

En una modalidad, la composición comprende además un adyuvante.

10 En una modalidad, la composición está formulada para administración sistémica.

En una modalidad, la administración sistémica es por vía intravenosa.

La divulgación se refiere además a una composición como se describe para uso terapéutico.

III. Métodos y composiciones para almacenar partículas lipoplejo de ARN.

15 En un tercer aspecto, la presente divulgación se refiere a métodos y composiciones para almacenar partículas de ARN lipoplejo sin pérdida sustancial de la calidad del producto y, en particular, sin pérdida sustancial de actividad de ARN. En particular, la presente divulgación se refiere a formulaciones que permiten la congelación, liofilización o secado por atomización de partículas de ARN lipoplejo sin pérdida sustancial de la calidad de las partículas de ARN lipoplejo y, en particular, sin pérdida sustancial de actividad de ARN.

Las formulaciones de partículas de ARN lipoplejo descritas en el presente documento pueden congelarse o deshidratarse mediante secado por congelación, secado por atomización o métodos relacionados, lo que permite obtener una vida útil prolongada de los productos en comparación con el almacenamiento líquido.

25 Para permitir la congelación, se agrega un estabilizador (crioprotector). En una modalidad, los lipoplejos se diluyen con el estabilizador (crioprotector), después de la fabricación, lo que permite ajustar la fuerza iónica, preferentemente para reducir la fuerza iónica y ajustar la concentración apropiada del estabilizador. Para congelar el producto, la concentración de estabilizador puede ser mayor que el valor para obtener la osmolalidad fisiológica. En ese caso, para la administración, el producto se diluye con una fase acuosa adecuada (por ejemplo, agua para inyección, solución salina) con el fin de ajustar la osmolalidad y la fuerza iónica deseadas. Como estabilizadores se pueden utilizar azúcares como glucosa, sacarosa o trehalosa, pero también otros compuestos, como dextranos.

Sorprendentemente, se ha encontrado de acuerdo con la divulgación que una formulación de ARN lipoplejo que comprende un estabilizador como se describe en el presente documento también se puede liofilizar. Para la liofilización, la concentración requerida de estabilizador (lioprotector) puede ser menor que para la congelación, y la concentración de NaCl tolerada (fuerza iónica) puede ser mayor que para la congelación. El producto también se puede secar por pulverización, si se requiere una deshidratación económica a gran escala.

El pH de algunas de las formulaciones de ARN lipoplejo se ajusta a un valor inferior al rango fisiológico habitual y el pH óptimo habitual para el almacenamiento de ARN en la fase a granel. El pH óptimo es aproximadamente 6.2, un intervalo adecuado está entre aproximadamente 5.7 y aproximadamente 6.7. Para otras formulaciones, el pH ideal puede ser incluso más bajo. Se plantea la hipótesis de que el pH local dentro de los lipoplejos de ARN es más alto que el pH de la fase a granel debido a las cargas positivas del lípido catiónico.

En aquellas modalidades de la divulgación en las que las composiciones de ARN lipoplejo se congelan para su almacenamiento, las composiciones se pueden descongelar y, opcionalmente, la osmolalidad, la fuerza iónica y/o el pH de la composición se pueden ajustar añadiendo un líquido acuoso. La composición resultante se puede administrar a un sujeto.

En aquellas modalidades de la divulgación en las que las composiciones de ARN lipoplejo se liofilizan o secan por congelación para su almacenamiento, las composiciones se pueden reconstituir añadiendo un líquido acuoso y, opcionalmente, la osmolalidad, la fuerza iónica y/o el pH de la composición se pueden ajustar añadiendo un líquido acuoso. La composición resultante se puede administrar a un sujeto.

Por consiguiente, en este aspecto, la divulgación se refiere a un método para preparar una composición congelada que comprende partículas de ARN lipoplejo que comprenden (i) proporcionar una composición acuosa que comprende partículas de ARN lipoplejo y un estabilizador y (ii) congelar la composición.

En una modalidad, la congelación es a una temperatura de aproximadamente -15 °C a aproximadamente -40 °C, o a aproximadamente -30 °C.

En una modalidad, la composición se almacena, por ejemplo, a una temperatura de almacenamiento de aproximadamente -15 °C a aproximadamente -40 °C, o aproximadamente -20 °C.

En una modalidad, el estabilizador es un carbohidrato seleccionado de un monosacárido, un disacárido, un trisacárido, un alcohol de azúcar, un oligosacárido o su correspondiente alcohol de azúcar y un polialcohol de cadena lineal.

En una modalidad, proporcionar una composición acuosa que comprende partículas de ARN lipoplejo y un estabilizador comprende proporcionar una composición acuosa que comprende partículas de ARN lipoplejo y añadir el estabilizador a la composición acuosa que comprende partículas de ARN lipoplejo. Por consiguiente, un método para preparar una composición para
5 congelar comprende proporcionar una composición acuosa que comprende partículas de ARN lipoplejo y añadir un estabilizador a la composición acuosa que comprende partículas de ARN lipoplejo.

En una modalidad, la adición del estabilizador a la composición acuosa que comprende partículas de ARN lipoplejo reduce la fuerza iónica de la composición acuosa que comprende
10 partículas de ARN lipoplejo.

En una modalidad, la concentración de estabilizador en la composición acuosa que comprende partículas de ARN lipoplejo y un estabilizador es mayor que el valor requerido para la osmolalidad fisiológica.

En una modalidad, la concentración de estabilizador en la composición acuosa que comprende
15 ARN lipoplejos y un estabilizador es suficiente para mantener la calidad de las partículas de ARN lipoplejo y, en particular, para evitar una pérdida sustancial de actividad del ARN después del almacenamiento de la composición. a una temperatura de aproximadamente -15 °C a aproximadamente -40 °C durante al menos un mes, durante al menos 6 meses, durante al menos 12 meses, durante al menos 24 meses o durante al menos 36 meses.

En una modalidad, la concentración de estabilizador en la composición acuosa que comprende lipoplejos de ARN y un estabilizador es de aproximadamente 5% a aproximadamente 35.0% (p/v), de aproximadamente 10% a aproximadamente 30.0% (p/v), de aproximadamente 12.5%
20 % a aproximadamente 25.0% (p/v), o aproximadamente 22.0% (p/v).

En una modalidad, el pH en la composición acuosa que comprende lipoplejos de ARN y un
25 estabilizador es más bajo que el pH óptimo habitual para el almacenamiento de ARN.

En una modalidad, la composición acuosa que comprende lipoplejos de ARN y un estabilizador comprende cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM, o comprende una fuerza iónica correspondiente al cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM.

En una modalidad, la composición acuosa que comprende lipoplejos de ARN y un estabilizador tiene una fuerza iónica correspondiente al cloruro de sodio a una concentración de
30 aproximadamente 20 mM.

En una modalidad, las partículas lipoplejo de ARN se pueden obtener mediante el método descrito anteriormente en I. y II.

En una modalidad, el método para preparar una composición congelada comprende además almacenar la composición congelada que comprende partículas de ARN lipoplejo. La
5 composición puede almacenarse a una temperatura que corresponda o corresponda esencialmente a la temperatura de congelación, o una temperatura que sea más alta o más baja que la temperatura de congelación. Generalmente, la composición se almacena a una temperatura de aproximadamente -15 °C a aproximadamente -40 °C, por ejemplo, a aproximadamente -20 °C

10 La divulgación se refiere además a una composición que comprende partículas de ARN lipoplejo que se pueden obtener mediante el método anterior para preparar una composición congelada. La divulgación también se refiere a una composición que comprende partículas de ARN lipoplejo que se pueden obtener mediante el método anterior para preparar una composición para congelar.

15 En una modalidad, las partículas lipoplejo de ARN comprenden al menos un lípido catiónico y al menos un lípido adicional.

En una modalidad, el ARN codifica un péptido o proteína que comprende al menos un epítipo, en donde la relación de cargas positivas a cargas negativas en las partículas de ARN lipoplejo es de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1.9:2, o aproximadamente 1.3:2.0.

20 En una modalidad, la composición comprende además cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM.

La divulgación se refiere además a una composición que comprende:

Partículas de ARN lipoplejo que comprenden:

25 ARN que codifica un péptido o proteína que comprende al menos un epítipo,
al menos un lípido catiónico y al menos un lípido adicional,
donde la relación de cargas positivas a cargas negativas en las partículas lipoplejo de ARN es de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1.9:2, o aproximadamente 1.3:2.0,
cloruro de sodio en una concentración de 0 mM a aproximadamente 40 mM, y
un estabilizador.

30 En una modalidad, la composición comprende además un tampón.

En una modalidad, la cantidad de ARN en la composición es de aproximadamente 0.01 mg/ml a aproximadamente 1 mg/ml, de aproximadamente 0.05 mg/ml a aproximadamente 0.5 mg/ml o aproximadamente 0.05 mg/ml.

En una modalidad, el cloruro de sodio está a una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 30 mM.

En una modalidad, el cloruro de sodio tiene una concentración de aproximadamente 20 mM.

En una modalidad, el cloruro de sodio tiene una concentración de aproximadamente 30 mM.

- 5 En una modalidad, la concentración de estabilizador en la composición es mayor que el valor requerido para la osmolalidad fisiológica.

En una modalidad, la concentración de estabilizador en la composición es de aproximadamente 5 a aproximadamente 35°C. peso por porcentaje de volumen (% p/v), o de aproximadamente 12.5 a aproximadamente 25 peso por porcentaje de volumen (% p/v).

- 10 En una modalidad, el estabilizador es un carbohidrato seleccionado de un monosacárido, un disacárido, un trisacárido, un alcohol de azúcar, un oligosacárido o su correspondiente alcohol de azúcar y un polialcohol de cadena lineal.

En una modalidad, el estabilizador es sacarosa a una concentración de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 por ciento en peso por volumen (% p/v).

- 15 En una modalidad, la sacarosa está en una concentración de aproximadamente el 15% (p/v) a aproximadamente el 25% (p/v).

En una modalidad, la sacarosa está en una concentración de aproximadamente 20% (p/v) a aproximadamente 25% (p/v).

En una modalidad, la sacarosa está en una concentración de aproximadamente 22% (p/v).

- 20 En una modalidad, la sacarosa está en una concentración de aproximadamente el 20% (p/v).

En una modalidad, la composición tiene un pH que es inferior al pH óptimo habitual para el almacenamiento de ARN.

En una modalidad, la composición tiene un pH de aproximadamente 5.7 a aproximadamente 6.7, o de aproximadamente 6.2.

- 25 En una modalidad, el tampón es ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfónico (HEPES por sus siglas en inglés).

En una modalidad, el HEPES está a una concentración de aproximadamente 2.5 mM a aproximadamente 10 mM, o de aproximadamente 7.5 mM.

En una modalidad, la composición comprende además un agente quelante.

- 30 La divulgación se refiere además a una composición que comprende:

Partículas de ARN lipoplejo que comprenden:

ARN que codifica un péptido o proteína que comprende al menos un epítipo a una concentración de aproximadamente 0.05 mg/ml, y

DOTMA y DOPE en una relación molar de aproximadamente 2:1,

donde la relación de cargas positivas a cargas negativas en las partículas lipoplejo de ARN es de aproximadamente 1.3:2.0,

cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 20 mM,

5 sacarosa en una concentración de aproximadamente 22% (p/v),

HEPES a una concentración de aproximadamente 7.5 mM con un pH de aproximadamente 6.2,
y

EDTA a una concentración de aproximadamente 2.5 mM.

En una modalidad, la composición está en estado líquido o congelado.

10 En una modalidad, la composición congelada es estable a una temperatura de aproximadamente -15 °C a aproximadamente -40 °C durante al menos un mes, durante al menos 6 meses, durante al menos 12 meses, durante al menos 24 meses, o durante al menos 36 meses.

En una modalidad, la composición congelada es estable a una temperatura de aproximadamente -15 °C durante al menos un mes, durante al menos 6 meses, durante al menos 12 meses, durante
15 al menos 24 meses, o durante al menos 36 meses.

En una modalidad, la composición congelada es estable a una temperatura de aproximadamente -15 °C durante al menos dos meses.

En una modalidad, la composición congelada es estable a una temperatura de aproximadamente -20 °C durante al menos un mes, durante al menos 6 meses, durante al menos 12 meses, durante
20 al menos 24 meses, o durante al menos 36 meses.

En una modalidad, la composición congelada es estable a una temperatura de aproximadamente -20 °C durante al menos dos meses.

En una modalidad, la composición congelada es estable a una temperatura de aproximadamente -30 °C durante al menos un mes, durante al menos 6 meses, durante al menos 12 meses, durante
25 al menos 24 meses, o durante al menos 36 meses.

En una modalidad, la composición congelada es estable a una temperatura de aproximadamente -30 °C durante al menos dos meses.

La divulgación se refiere además a una composición acuosa que comprende partículas de ARN lipoplejo que se pueden obtener descongelando la composición congelada anterior y ajustando
30 opcionalmente la osmolalidad y la fuerza iónica añadiendo un líquido acuoso.

En una modalidad, la osmolalidad de la composición es de aproximadamente 200 mOsmol/kg a aproximadamente 450 mOsmol/kg.

En una modalidad, la composición comprende cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 80 mM a aproximadamente 150 mM.

En una modalidad, las partículas de ARN lipoplejo se pueden obtener mediante el método descrito anteriormente en I. y II.

5

La divulgación se refiere además a un método para preparar una composición deshidratada, por ejemplo, liofilizada o secada por atomización que comprende partículas de ARN lipoplejo que comprenden (i) proporcionar una composición acuosa que comprende partículas de ARN lipoplejo y un estabilizador y (ii) deshidratar, por ejemplo, liofilizar o secar por pulverización, la composición.

10

En una modalidad, el estabilizador es un carbohidrato seleccionado de un monosacárido, un disacárido, un trisacárido, un alcohol de azúcar, un oligosacárido o su correspondiente alcohol de azúcar y un polialcohol de cadena lineal.

En una modalidad, proporcionar una composición acuosa que comprende partículas de ARN lipoplejo y un estabilizador comprende proporcionar una composición acuosa que comprende partículas de ARN lipoplejo y añadir el estabilizador a la composición acuosa que comprende partículas de ARN lipoplejo. Por consiguiente, un método para preparar una composición para deshidratación, por ejemplo, liofilización o secado por atomización, comprende proporcionar una composición acuosa que comprende partículas de ARN lipoplejo y añadir un estabilizador a la composición acuosa que comprende partículas de ARN lipoplejo.

15

20

En una modalidad, la adición del estabilizador a la composición acuosa que comprende partículas lipoplejo de ARN reduce la fuerza iónica de la composición acuosa que comprende partículas lipoplejo de ARN.

En una modalidad, la concentración de estabilizador en la composición acuosa que comprende partículas de ARN lipoplejo y un estabilizador es mayor que el valor requerido para la osmolalidad fisiológica.

25

En una modalidad, la concentración de estabilizador en la composición acuosa que comprende partículas de ARN lipoplejo y un estabilizador es suficiente para mantener la calidad de las partículas de ARN lipoplejo y, en particular, para evitar una pérdida sustancial de la actividad del ARN después del almacenamiento de la composición durante al menos un mes, durante al menos 6 meses, durante al menos 12 meses, durante al menos 24 meses, o durante al menos 36 meses.

30

En una modalidad, la concentración de estabilizador en la composición acuosa que comprende lipoplejos de ARN y un estabilizador es de aproximadamente 5% a aproximadamente 35.0% (p/v), de aproximadamente 10% a aproximadamente 30.0% (p/v), de aproximadamente 12.5% a aproximadamente 25.0% (p/v), o aproximadamente 22.0% (p/v).

- 5 En una modalidad, el pH en la composición acuosa que comprende lipoplejos de ARN y un estabilizador es más bajo que el pH óptimo habitual para el almacenamiento de ARN.

En una modalidad, la composición acuosa que comprende lipoplejos de ARN y un estabilizador comprende cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 80 mM o de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM, o
10 comprende una fuerza iónica correspondiente al cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 80 mM o de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM.

- En una modalidad, la composición acuosa que comprende lipoplejos de ARN y un estabilizador tiene una fuerza iónica correspondiente al cloruro de sodio a una concentración de
15 aproximadamente 20 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 60 mM o aproximadamente 80 mM.

En una modalidad, las partículas lipoplejo de ARN se pueden obtener mediante el método descrito anteriormente en I. y II.

- En una modalidad, el método para preparar una composición deshidratada, por ejemplo,
20 liofilizada o secada por atomización, comprende además almacenar la composición liofilizada o secada por atomización que comprende partículas de ARN lipoplejo. Generalmente, la composición se almacena a una temperatura de aproximadamente -15 °C a aproximadamente -40 °C, por ejemplo, a aproximadamente -20 °C. En determinadas modalidades, la composición se almacena a una temperatura superior a 0 °C, por ejemplo, a aproximadamente 25 °C o
25 aproximadamente 4 °C, o por ejemplo a temperatura ambiente.

- La divulgación se refiere además a una composición que comprende partículas de ARN lipoplejo que se pueden obtener mediante el método anterior de preparar una composición deshidratada, por ejemplo, liofilizada o secada por atomización. La divulgación también se refiere a una composición que comprende partículas de ARN lipoplejo que se pueden obtener
30 mediante el método anterior para preparar una composición para la deshidratación, por ejemplo, liofilización o secado por atomización.

En una modalidad, las partículas lipoplejo de ARN comprenden al menos un lípido catiónico y al menos un lípido adicional.

En una modalidad, el ARN codifica un péptido o proteína que comprende al menos un epítipo, en donde la relación de cargas positivas a cargas negativas en las partículas de ARN lipoplejo es de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1.9:2, o aproximadamente 1.3:2.0.

En una modalidad, la composición comprende además cloruro de sodio a una concentración de
5 aproximadamente 10 mM a aproximadamente 80 mM o de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM.

La divulgación se refiere además a una composición que comprende:

Partículas de ARN lipoplejo que comprenden:

ARN que codifica un péptido o proteína que comprende al menos un epítipo,
10 al menos un lípido catiónico y al menos un lípido adicional,
donde la relación de cargas positivas a cargas negativas en las partículas lipoplejo de ARN es de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1.9:2, o aproximadamente 1.3:2.0, cloruro de sodio en una concentración de 10 mM a aproximadamente 80 mM, y un estabilizador.

15 En una modalidad, la composición comprende además un tampón.

En una modalidad, la cantidad de ARN en la composición es de aproximadamente 0.01 mg/ml a aproximadamente 1 mg/ml, de aproximadamente 0.05 mg/ml a aproximadamente 0.5 mg/ml o aproximadamente 0.05 mg/ml.

En una modalidad, el cloruro de sodio está a una concentración de aproximadamente 20 mM a
20 aproximadamente 30 mM.

En una modalidad, el cloruro de sodio tiene una concentración de aproximadamente 20 mM.

En una modalidad, el cloruro de sodio tiene una concentración de aproximadamente 30 mM.

En una modalidad, la concentración de estabilizador en la composición es mayor que el valor requerido para la osmolalidad fisiológica.

25 En una modalidad, la concentración de estabilizador en la composición es de aproximadamente 5 a aproximadamente 35°C. peso por porcentaje de volumen (% p/v), o de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 peso por porcentaje de volumen (% p/v).

En una modalidad, el estabilizador es un carbohidrato seleccionado de un monosacárido, un disacárido, un trisacárido, un alcohol de azúcar, un oligosacárido o su correspondiente alcohol
30 de azúcar y un polialcohol de cadena lineal.

En una modalidad, el estabilizador es trehalosa a una concentración de aproximadamente 5 a aproximadamente 35 por ciento en peso en volumen (% p/v).

En una modalidad, la trehalosa está en una concentración de aproximadamente 5% (p/v) a aproximadamente 25% (p/v).

En una modalidad, la trehalosa está en una concentración de aproximadamente el 10% (p/v) a aproximadamente el 25% (p/v).

5 En una modalidad, la trehalosa está en una concentración de aproximadamente el 10% (p/v).

En una modalidad, la trehalosa está en una concentración de aproximadamente el 15% (p/v).

En una modalidad, la composición tiene un pH que es inferior al pH óptimo habitual para el almacenamiento de ARN.

En una modalidad, la composición tiene un pH de aproximadamente 5.7 a aproximadamente

10 6.7, o de aproximadamente 6.2.

En una modalidad, el tampón es ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfónico (HEPES).

En una modalidad, el HEPES está a una concentración de aproximadamente 2.5 mM a aproximadamente 10 mM, o de aproximadamente 7.5 mM.

15 En una modalidad, la composición comprende además un agente quelante.

La divulgación se refiere además a una composición que comprende:

Partículas de ARN lipoplejo que comprenden:

ARN que codifica un péptido o proteína que comprende al menos un epítipo a una concentración de aproximadamente 0.05 mg/ml, y

20 DOTMA y DOPE en una relación molar de aproximadamente 2:1,

donde la relación de cargas positivas a cargas negativas en las partículas lipoplejo de ARN es de aproximadamente 1.3:2.0,

cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 20 mM,

trehalosa en una concentración de aproximadamente el 10% (p/v),

25 HEPES a una concentración de aproximadamente 7.5 mM con un pH de aproximadamente 6.2, y

EDTA a una concentración de aproximadamente 2.5 mM.

En una modalidad, la composición está en estado líquido o deshidratado, por ejemplo, liofilizado o secado por congelación.

30 En una modalidad, la composición deshidratada, por ejemplo, liofilizada o deshidratada por congelación, es estable durante al menos un mes, durante al menos 6 meses, durante al menos 12 meses, durante al menos 24 meses, o durante al menos 36 meses. En una modalidad, la

composición se almacena a una temperatura superior a 0 °C, por ejemplo, a aproximadamente 25 °C o aproximadamente 4 °C, o por ejemplo a temperatura ambiente.

En una modalidad, la composición deshidratada, por ejemplo, liofilizada o deshidratada por congelación, es estable durante al menos un mes.

- 5 En una modalidad, la composición deshidratada, por ejemplo, liofilizada o deshidratada por congelación, es estable durante al menos dos meses.

- 10 La divulgación se refiere además a una composición acuosa que comprende partículas de ARN lipoplejo que se pueden obtener reconstituyendo lo anterior deshidratado, por ejemplo, liofilizado o liofilizado, composición y opcionalmente ajustar la osmolalidad y la fuerza iónica añadiendo un líquido acuoso.

En una modalidad, la osmolalidad de la composición es de aproximadamente 150 mOsmol/kg a aproximadamente 450 mOsmol/kg.

- 15 En una modalidad, la composición comprende cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 80 mM a aproximadamente 150 mM.

En una modalidad, las partículas de ARN lipoplejo se pueden obtener mediante el método descrito anteriormente en I. y II.

- 20 En una modalidad, las partículas de ARN lipoplejo descritas en este aspecto en III. se caracterizan por un solo pico de Bragg a aproximadamente 1 nm^{-1} , donde el ancho del pico es menor que 0.2 nm^{-1}

- En una modalidad, las partículas lipoplejo de ARN descritas en este aspecto en III. tienen un diámetro medio que oscila entre 200 a aproximadamente 800 nm, desde aproximadamente 250 hasta aproximadamente 700 nm, desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 600 nm, desde aproximadamente 300 nm hasta aproximadamente 500 nm, o desde aproximadamente 25 350 nm hasta aproximadamente 400 nm.

En una modalidad, las partículas de ARN lipoplejo tienen un índice de polidispersidad menor de aproximadamente 0.5, menor de aproximadamente 0.4 o menor de aproximadamente 0.3.

En una modalidad, el al menos un lípido catiónico comprende 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA) y/o 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP).

- 30 En una modalidad, los al menos un lípido adicional comprende 1,2-di-(9Z-octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), colesterol (Chol) y/o 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC).

En una modalidad, los al menos un lípido catiónico comprende 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA) y el al menos un lípido adicional comprende 1,2-di-(9Z-octadecenoil)-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina (DOPE).

5 En una modalidad, la relación molar del al menos un lípido catiónico al al menos un lípido adicional es de aproximadamente 10:0 a aproximadamente 1:9, de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2, de aproximadamente de 3:1 a aproximadamente 1:1, o aproximadamente 2:1.

10 En una modalidad, las Partículas de ARN lipoplejo comprenden DOTMA y DOPE en una relación molar de aproximadamente 10:0 a 1:9, de aproximadamente 4:1 a 1:2, de aproximadamente de 3:1 a aproximadamente 1:1, o aproximadamente 2:1 y en donde la relación de carga de las cargas positivas en DOTMA a las cargas negativas en el ARN es de aproximadamente 1:2 a 1.9:2.

En una modalidad, el agente quelante es ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

15 En una modalidad, el EDTA está en una concentración de aproximadamente 0.25 mM a aproximadamente 5 mM, o de aproximadamente 2.5 mM.

En una modalidad, la composición comprende además un adyuvante.

En una modalidad, la composición está formulada para administración sistémica.

En una modalidad, la administración sistémica es por vía intravenosa.

La divulgación se refiere además a una composición como se describe para uso terapéutico.

20 La divulgación se refiere además a un método para preparar una composición acuosa. que comprende partículas de ARN lipoplejo que comprenden descongelar la composición congelada descrita anteriormente o reconstituir la composición liofilizada o secada por atomización descrita anteriormente y ajustar opcionalmente la osmolalidad y la fuerza iónica añadiendo un líquido acuoso.

25 En una modalidad, se añade un líquido acuoso para obtener una osmolalidad de la composición de aproximadamente 200 mOsmol/kg a aproximadamente 450 mOsmol/kg.

En una modalidad, se agrega un líquido acuoso para obtener cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 80 mM a aproximadamente 150 mM.

30 Algunas formulaciones de ARN lipoplejo descritas en este documento que son adecuadas para almacenar partículas de ARN lipoplejo sin una pérdida sustancial de la calidad del producto y, en particular, sin una pérdida sustancial de la actividad del ARN, no requieren modificación del producto, en particular dilución del producto con una solución acuosa. fase (por ejemplo, agua para inyección, solución salina) para ajustar la osmolalidad y la fuerza iónica deseadas antes de

la administración. Dichas formulaciones de lipoplejo de ARN se pueden administrar directamente después del almacenamiento y, opcionalmente, después de la descongelación o reconstitución del producto. En aquellas modalidades de la divulgación en las que las composiciones de ARN lipoplejo se congelan para su almacenamiento, las composiciones se pueden descongelar y administrar sin necesidad de ajustar la osmolalidad, la fuerza iónica y/o el pH de la composición.

Por consiguiente, la divulgación se refiere a una composición que comprende:

Partículas de ARN lipoplejo que comprenden:

ARN y

al menos un lípido catiónico y al menos un lípido adicional, cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 10 mM o menos, un estabilizador a una concentración de aproximadamente el 10% en peso por porcentaje en volumen (% p/v) o menos, y un tampón.

En una modalidad, el cloruro de sodio está a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM. En una modalidad, el cloruro de sodio está a una concentración de aproximadamente 7.5 mM o menos, tal como de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 7.5 mM. En una modalidad, el cloruro de sodio está a una concentración de aproximadamente 6.5 mM o aproximadamente 7.5 mM.

En una modalidad, la concentración de sal y/o estabilizador en la composición es aproximadamente el valor requerido para la osmolalidad fisiológica. En una modalidad, la osmolalidad resultante de los componentes disueltos, incluidos los componentes iónicos y no iónicos, se encuentra aproximadamente en el valor requerido para la osmolalidad fisiológica.

En una modalidad, la concentración de estabilizador en la composición es de aproximadamente 5 a aproximadamente 10% (p/v). En una modalidad, la concentración de estabilizador en la composición es de aproximadamente 5 a aproximadamente 7.5% (p/v). En una modalidad, la concentración de estabilizador en la composición es de aproximadamente 7.5 a aproximadamente 10% (p/v).

En una modalidad, el estabilizador es un carbohidrato seleccionado de un monosacárido, un disacárido, un trisacárido, un alcohol de azúcar, un oligosacárido o su correspondiente alcohol de azúcar y un polialcohol de cadena lineal.

En una modalidad, el estabilizador es sacarosa o trehalosa. En una modalidad, el estabilizador es sacarosa a una concentración de aproximadamente 5 a aproximadamente 10% (p/v). En una

modalidad, la sacarosa está a una concentración de aproximadamente el 10% (p/v). En una modalidad, el estabilizador es trehalosa a una concentración de aproximadamente 5 a aproximadamente 10% (p/v). En una modalidad, la trehalosa está a una concentración de aproximadamente el 10% (p/v).

5 En una modalidad, el tampón se selecciona del grupo que consiste en ácido 2-[4-(2-hidroxietil) piperazin-1-il]etanosulfónico (HEPES), histidina, ácido acético/acetato de sodio y MES (2-(N-ácido morfolino)etanosulfónico). En una modalidad, el tampón es HEPES, histidina o MES. En una modalidad, el búfer es HEPES o MES. En una modalidad, el tampón es HEPES.

10 En una modalidad, la composición tiene un pH de 6.0 a 7.2, de 6.0 a 7.0, de 6.2 a 7.0, de 6.5 a 7.0, o de 6.5 a 6.7. En una modalidad, la composición tiene un pH de aproximadamente 6.5 o 6.7.

En una modalidad, el tampón está presente en una concentración de 2.5 mM a 10 mM. En una modalidad, el tampón está presente en una concentración de 2.5 mM a 5 mM. En una modalidad, el tampón está presente en una concentración de 5 mM a 10 mM. En una modalidad, el tampón está presente en una concentración de 5 mM a 7.5 mM. En una modalidad, el tampón está presente en una concentración de 7.5 mM a 10 mM. En una modalidad, el tampón está presente a una concentración de aproximadamente 7.5 mM.

20 En una modalidad, el tampón es HEPES a una concentración de aproximadamente 7.5 mM o menos, por ejemplo, de 2.5 mM a 7.5 mM o de 5 mM a 7.5 mM, con un pH de aproximadamente 6.5 o aproximadamente 6.7.

En una modalidad, el al menos un lípido catiónico comprende 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA) y/o 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP). En una modalidad, el al menos un lípido adicional comprende 1,2-di-(9Z-octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), colesterol (Chol) y/o 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC). En una modalidad, el al menos un lípido catiónico comprende 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA) y el al menos un lípido adicional comprende 1,2-di-(9Z-octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE).

25 En una modalidad, la relación molar del al menos un lípido catiónico al al menos un lípido adicional es de aproximadamente 10:0 a aproximadamente 1:9, de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2, de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:1, o aproximadamente 2:1.

En una modalidad, las partículas de ARN lipoplejo comprenden DOTMA y DOPE en una relación molar de aproximadamente 10:0 a 1:9, de aproximadamente 4:1 a 1:2, de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:1, o aproximadamente 2:1.

En una modalidad, la composición comprende además un agente quelante. En una modalidad, el agente quelante es ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). En una modalidad, el EDTA está a una concentración de aproximadamente 3.5 mM o menos, o de aproximadamente 0.25 mM a aproximadamente 3.5 mM, o de aproximadamente 0.25 mM a aproximadamente 2.5 mM.

En una modalidad de la composición descrita en este documento, el ARN codifica un péptido o proteína que comprende al menos un epítipo, en donde la proporción de cargas positivas a cargas negativas en la composición es de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1.9:2, o aproximadamente 1.3:2.0.

La divulgación se refiere además a una composición que comprende:

Partículas de ARN lipoplejo que comprenden:

ARN que codifica un péptido o proteína que comprende al menos un epítipo,

DOTMA y DOPE en una relación molar de aproximadamente 2:1,

donde la relación de cargas positivas a cargas negativas en la composición es aproximadamente 1.3:2.0,

cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 7.5 mM,

sacarosa en una concentración de aproximadamente el 10% (p/v),

HEPES a una concentración de aproximadamente 7.5 mM con un pH de aproximadamente 6.5 o aproximadamente 6.7, y

EDTA a una concentración de aproximadamente 2.5 mM.

En una modalidad de la composición descrita en este documento, las partículas lipoplejo de ARN tienen un diámetro promedio que varía de aproximadamente 200 a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 250 a aproximadamente 700 nm, de aproximadamente 400 a aproximadamente 600 nm, de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 500 nm, o desde aproximadamente 350 nm hasta aproximadamente 400 nm.

En una modalidad de la composición descrita en el presente documento, la cantidad de ARN en la composición es de aproximadamente 0.01 mg/ml a aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 0.05 mg/ml a aproximadamente 0.5 mg/ml, aproximadamente 0.05 mg/ml, o aproximadamente 0.02 mg/mL.

En una modalidad de la composición descrita en el presente documento, la composición comprende además un adyuvante.

En una modalidad de la composición descrita en este documento, la composición está en estado líquido, congelado o deshidratado.

En una modalidad, la composición es una composición congelada y es estable a una temperatura de aproximadamente -15 °C durante al menos un mes. En una modalidad, la composición es una composición congelada y es estable a una temperatura de aproximadamente -15 °C durante al menos dos meses. En una modalidad, la composición es una composición congelada y es estable a una temperatura de aproximadamente -15 °C durante al menos cuatro meses. En una modalidad, la composición es una composición congelada y es estable a una temperatura de aproximadamente -15 °C durante al menos seis meses.

10 La divulgación se refiere además a una composición líquida que comprende partículas lipoplejo de ARN que se pueden obtener descongelando la composición congelada descrita en el presente documento. En una modalidad, la composición líquida tiene una composición como la descrita anteriormente.

15 La divulgación se refiere además a una composición líquida que comprende partículas lipoplejo de ARN que se pueden obtener disolviendo la composición deshidratada descrita en el presente documento. En una modalidad, la composición líquida tiene una composición como la descrita anteriormente.

En una modalidad, la composición líquida descrita en este documento es una composición acuosa.

20 En una modalidad, la composición, en particular la composición líquida descrita en el presente documento se puede administrar directamente a un sujeto.

En una modalidad, la composición descrita en este documento es una composición farmacéutica.

25 En una modalidad, la composición descrita en este documento se formula para administración sistémica.

En una modalidad, la administración sistémica es por administración intravenosa.

La divulgación se refiere además a la composición descrita en el presente documento para uso terapéutico.

30 La divulgación se refiere además a un método para preparar una composición líquida para la administración directa a un sujeto que comprende partículas lipoplejo de ARN que comprenden descongelar la composición congelada descrita en el presente documento. La divulgación se refiere además a un método para preparar una composición líquida para la administración directa a un sujeto que comprende partículas lipoplejo de ARN que comprenden disolver la

composición deshidratada descrita en el presente documento. En una modalidad de los métodos descritos en este documento, la composición líquida es una composición acuosa. En una modalidad, la composición líquida tiene una composición como la descrita anteriormente. Para una aplicación terapéutica como se describe en este documento, la composición líquida descrita en este documento se administra a un sujeto.

Otras modalidades son las siguientes:

1. Un método para producir un coloide de liposomas que comprende inyectar una solución de lípidos en etanol en una fase acuosa para producir el coloide de liposomas, en donde la concentración de al menos uno de los lípidos en la solución de lípidos corresponde a o es mayor que la solubilidad en equilibrio del al menos un lípido en etanol.
2. El método de la modalidad 1, en donde la solución de lípidos es una solución de una mezcla de dos o más lípidos diferentes.
3. El método de la modalidad 1 o 2, en donde la concentración de un lípido en la solución de lípidos corresponde a o es más alta que la solubilidad en equilibrio del lípido en etanol a temperatura ambiente.
4. El método de una cualquiera de las modalidades 1 a 3, en donde la concentración total de lípidos en la solución de lípidos es de aproximadamente 180 mM a aproximadamente 600 mM, de aproximadamente 300 mM a aproximadamente 600 mM, o aproximadamente 330 mM.
5. El método de una cualquiera de las modalidades 1 a 4, en donde la solución de lípidos comprende al menos un lípido catiónico y al menos un lípido adicional.
6. El método de la modalidad 5, en donde la concentración de un lípido adicional en la solución de lípidos corresponde a o es mayor que la solubilidad en equilibrio del lípido adicional en etanol.
7. El método de la modalidad 5 o 6, en donde el al menos un lípido catiónico comprende 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA) y/o 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP).
8. El método de una cualquiera de las modalidades 5 a 7, en donde el al menos un lípido adicional comprende 1,2-di-(9Z-octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), colesterol (Chol) y/o 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC).
9. El método de una cualquiera de las modalidades 5 a 8, en donde el al menos un lípido catiónico comprende 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA) y el al menos

un lípido adicional comprende 1.2-di-(9Z-octadecenoil)-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina (DOPE).

10. El método de una cualquiera de las modalidades 5 a 9, en donde la relación molar del al menos un lípido catiónico al al menos un lípido adicional es de aproximadamente 10:0 a aproximadamente 1:9, de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2, desde aproximadamente 3:1 hasta aproximadamente 1:1, o aproximadamente 2:1.
11. El método de una cualquiera de las modalidades 1 a 10, en donde la solución lipídica comprende DOTMA y DOPE en una relación molar de aproximadamente 10:0 a aproximadamente 1:9, de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2, de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:1, o aproximadamente 2:1.
12. El método de una cualquiera de las modalidades 8 a 11, en donde la concentración de DOPE en la solución de lípidos es al menos aproximadamente 60 mM, o al menos aproximadamente 90 mM.
13. El método de una cualquiera de las modalidades 1 a 12, en donde la solución de lípidos se inyecta en la fase acuosa a una velocidad de agitación de la fase acuosa de aproximadamente 50 rpm a aproximadamente 150 rpm.
14. El método de una cualquiera de las modalidades 1 a 13, en donde la fase acuosa es agua.
15. El método de una cualquiera de las modalidades 1 a 14, en donde el método comprende además agitar el coloide liposómico.
16. El método de una cualquiera de las modalidades 1 a 15, en donde el coloide liposómico se agita durante aproximadamente 15 min a aproximadamente 60 min, o durante aproximadamente 30 min.
17. Un método para producir un coloide de liposomas que comprende inyectar una solución lipídica que comprende DOTMA y DOPE en una relación molar de aproximadamente 2:1 en etanol en agua agitada a una velocidad de agitación de aproximadamente 150 rpm para producir el coloide de liposomas, en donde la concentración de DOTMA y La DOPE en la solución de lípidos es de aproximadamente 330 mM.
18. Un coloide de liposomas que se puede obtener mediante el método de una cualquiera de las modalidades 1 a 17.
19. El coloide de liposomas de la modalidad 18, donde los liposomas tienen un diámetro medio de al menos aproximadamente 250 nm.
20. El coloide de liposomas de la modalidad 18 o 19, donde los liposomas tienen un diámetro promedio que varía de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 800 nm.

21. El coloide de liposomas de cualquiera de las modalidades 18 a 20, donde los liposomas son liposomas catiónicos.
22. El coloide de liposomas de cualquiera de las modalidades 18 a 21, donde los liposomas comprenden al menos un lípido catiónico y al menos un lípido adicional.
- 5 23. El coloide de liposomas de la modalidad 22, Donde en el al menos un lípido catiónico comprende 1.2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA) y/o 1.2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP).
24. El coloide de liposomas de la modalidad 22 o 23, en donde el al menos un lípido adicional comprende 1.2-di-(9Z-octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE),
10 colesterol (Chol) y/o 1.2 -dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC).
25. El coloide de liposomas de una cualquiera de las modalidades 22 a 24, en donde el al menos un lípido catiónico comprende 1.2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA) y el al menos un lípido adicional comprende 1.2-di - (9Z-octadecenoil) -sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE).
- 15 26. El coloide liposómico de una cualquiera de las modalidades 22 a 25, en donde la relación molar del al menos un lípido catiónico al al menos un lípido adicional es de aproximadamente 10:0 a aproximadamente 1:9, de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2, de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:1, o aproximadamente 2:1.
27. El coloide de liposomas de una cualquiera de las modalidades 18 a 26, en donde los
20 liposomas comprenden DOTMA y DOPE en una relación molar de aproximadamente 10:0 a aproximadamente 1:9, de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2, de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:1, o aproximadamente 2:1.
28. Un método para preparar partículas lipoplejo de ARN que comprende añadir el coloide liposómico de una cualquiera de las modalidades 18 a 27 a una solución que comprende ARN.
- 25 29. Un método para la fabricación de flujo continuo de partículas lipoplejo de ARN que comprende mezclar una solución que comprende ARN y una solución que comprende liposomas catiónicos en condiciones controladas de mezcla del ARN y los liposomas catiónicos.
- 30 30. El método de la modalidad 29, en donde la solución que comprende liposomas catiónicos es el coloide de liposomas de una cualquiera de las modalidades 18 a 27.
31. El método de la modalidad 29 o 30, en donde la solución que comprende ARN y la solución que comprende liposomas catiónicos son soluciones acuosas.

32. El método de una cualquiera de las modalidades 29 a 31, en donde se usa un caudal que permite mezclar la solución que comprende ARN y la solución que comprende liposomas catiónicos.
- 5 33. El método de una cualquiera de las modalidades 29 a 32, en donde el flujo se caracteriza por un número de Reynolds superior a 300, o de aproximadamente 500 a aproximadamente 2100.
34. El método de una cualquiera de las modalidades 29 a 33, en donde las condiciones de mezcla controladas comprenden controlar la proporción de mezcla de la solución que comprende ARN y la solución que comprende liposomas catiónicos.
- 10 35. El método de una cualquiera de las modalidades 29 a 34, en donde las condiciones de mezcla controladas comprenden controlar el volumen relativo de la solución que comprende ARN y la solución que comprende liposomas catiónicos que se van a mezclar.
36. El método de una cualquiera de las modalidades 29 a 35, en donde la proporción de mezcla del ARN y los liposomas catiónicos se controla usando volumen de mezcla idéntico (v/v) de la solución que comprende ARN y la solución que comprende liposomas catiónicos y ajustando las concentraciones de ARN y liposomas catiónicos en las respectivas soluciones.
- 15 37. El método de una cualquiera de las modalidades 29 a 36, en donde las condiciones de mezcla controladas se seleccionan para mantener las características de las partículas lipoplejo de ARN mientras se evita la obstrucción.
- 20 38. El método de una cualquiera de las modalidades 29 a 37, en donde el método comprende utilizar un elemento de mezcla de tipo Y o de tipo T.
39. El método de una cualquiera de las modalidades 29 a 38, en donde el elemento de mezcla de tipo Y o tipo T tiene un diámetro de aproximadamente 1.2 mm a aproximadamente 50 mm.
40. El método de una cualquiera de las modalidades 29 a 39, en donde el método comprende usar una bomba de jeringa, donde dos jeringas, una que comprende la solución que comprende liposomas catiónicos y otra que comprende la solución que comprende ARN se insertan en paralelo en la misma bomba.
- 25 41. El método de una cualquiera de las modalidades 29 a 40, en donde el método comprende el uso de un recipiente presurizado, una bomba de membrana, una bomba de engranajes, una bomba de levitación magnética o una bomba peristáltica en combinación con sensores de caudal, opcionalmente con circuito de retroalimentación para control en línea y ajuste en tiempo real del caudal.
- 30

42. El método de una cualquiera de las modalidades 29 a 41, en donde la mezcla de la solución que comprende ARN y la solución que comprende liposomas comprende cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 45 mM a aproximadamente 300 mM, o comprende una fuerza iónica correspondiente al cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 45 mM a aproximadamente 300 mM.
43. El método de una cualquiera de las modalidades 29 a 42, en donde la mezcla de la solución que comprende ARN y la solución que comprende liposomas tiene una fuerza iónica de al menos aproximadamente 50 mM.
44. El método de una cualquiera de las modalidades 28 a 43, en donde en un patrón de dispersión de rayos X los lipoplejos de ARN se caracterizan por un solo pico de Bragg a aproximadamente 1 nm^{-1} , donde el ancho del pico es menor que 0.2 nm^{-1} .
45. El método de cualquiera de las modalidades 28 a 44, en donde las partículas de ARN lipoplejo tienen un diámetro medio que oscila entre 200 a aproximadamente 800 nm, desde aproximadamente 250 hasta aproximadamente 700 nm, desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 600 nm, desde aproximadamente 300 nm hasta aproximadamente 500 nm, o desde aproximadamente 350 nm hasta aproximadamente 400 nm.
46. Un método para preparar una composición congelada que comprende partículas de ARN lipoplejo que comprenden (i) proporcionar una composición acuosa que comprende Partículas de ARN lipoplejo y un estabilizador y (ii) congelar la composición.
47. El método de la modalidad 46, en donde la congelación es a una temperatura de aproximadamente -15°C a aproximadamente -40°C , o a aproximadamente -30°C .
48. El método de la modalidad 47, en donde el estabilizador es un carbohidrato seleccionado de un monosacárido, un disacárido, un trisacárido, un alcohol de azúcar, un oligosacárido o su correspondiente alcohol de azúcar y un polialcohol de cadena lineal.
49. El método de una cualquiera de las modalidades 46 a 48, en donde proporcionar una composición acuosa que comprende partículas de ARN lipoplejo y un estabilizador comprende proporcionar una composición acuosa que comprende partículas de ARN lipoplejo y añadir el estabilizador a la composición acuosa que comprende partículas de ARN lipoplejo.
50. El método de una cualquiera de las modalidades 46 a 49, en donde la adición del estabilizador a la composición acuosa que comprende partículas de ARN lipoplejo reduce la fuerza iónica de la composición acuosa que comprende partículas de ARN lipoplejo.

51. El método de una cualquiera de las modalidades 46 a 50, en donde la concentración de estabilizador en la composición acuosa que comprende partículas de ARN lipoplejo y un estabilizador es mayor que el valor requerido para la osmolalidad fisiológica.
52. El método de una cualquiera de las modalidades 46 a 51, en donde la concentración de estabilizador en la composición acuosa que comprende ARN lipoplejos y un estabilizador es suficiente para mantener la calidad de las partículas de ARN lipoplejo y, en particular, para evitar una pérdida sustancial de actividad del ARN después almacenamiento de la composición a una temperatura de aproximadamente -15 °C a aproximadamente -40 °C durante al menos un mes, durante al menos 6 meses, durante al menos 12 meses, durante al menos 24 meses o durante al menos 36 meses.
53. El método de una cualquiera de las modalidades 46 a 52, en donde el pH en la composición acuosa que comprende lipoplejos de ARN y un estabilizador es menor que el pH óptimo habitual para el almacenamiento de ARN.
54. El método de una cualquiera de las modalidades 46 a 53, en donde la composición acuosa que comprende lipoplejos de ARN y un estabilizador comprende cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM, o comprende una fuerza iónica correspondiente al cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM.
55. El método de una cualquiera de las modalidades 46 a 54, en donde la composición acuosa que comprende lipoplejos de ARN y un estabilizador tiene una fuerza iónica correspondiente al cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 20 mM.
56. El método de una cualquiera de las modalidades 46 a 55, en donde las partículas de ARN lipoplejo se pueden obtener mediante el método de una cualquiera de las modalidades 28 a 44.
57. Una composición que comprende partículas de lipoplejo de ARN que se pueden obtener mediante el método de una cualquiera de las modalidades 28 a 45.
58. La composición de la modalidad 57, en donde las partículas lipoplejo de ARN comprenden al menos un lípido catiónico y al menos un lípido adicional.
59. La composición de la modalidad 57 o 58, en donde el ARN codifica un péptido o proteína que comprende al menos un epítipo, en donde la relación de cargas positivas a cargas negativas en las partículas de ARN lipoplejo es de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1.9:2, o aproximadamente 1.3:2.0.
60. Una composición que comprende:

Partículas de ARN lipoplejo que comprenden:

ARN que codifica un péptido o proteína que comprende al menos un epítipo, y
al menos un lípido catiónico y al menos un lípido adicional,

donde la relación de cargas positivas a cargas negativas en las partículas lipoplejo de

5 ARN es de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1.9:2, o aproximadamente 1.3:2.0 y

donde las partículas de ARN lipoplejo se caracterizan por un solo pico de Bragg a
aproximadamente 1 nm^{-1} , donde el ancho del pico es menor que 0.2 nm^{-1} .

61. La composición de cualquiera de las modalidades 57 a 60, donde la composición
comprende además cloruro de sodio en una concentración de aproximadamente 10 a
10 aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 45 mM a aproximadamente 300 mM, desde
aproximadamente 10 mM hasta aproximadamente 50 mM, o desde aproximadamente 80 mM
hasta aproximadamente 150 mM.

62. La composición de cualquiera de las modalidades 57 a 61, donde la composición
comprende además un tampón.

15 63. La composición de cualquiera de las modalidades 57 a 62, donde la composición
comprende además un agente quelante.

64. Una composición que comprende Partículas de lipoplejo de ARN que se pueden obtener
mediante el método de una cualquiera de las modalidades 46 a 56.

20 65. La composición de la modalidad 64, en donde las partículas lipoplejo de ARN
comprenden al menos un lípido catiónico y al menos un lípido adicional.

66. La composición de la modalidad 64 o 65, en donde el ARN codifica un péptido o
proteína que comprende al menos un epítipo, en donde la relación de cargas positivas a cargas
negativas en las partículas de ARN lipoplejo es de aproximadamente 1:2 a aproximadamente
1.9:2, o aproximadamente 1.3:2.0.

25 67. La composición de una cualquiera de las modalidades 64 a 66, en donde la composición
comprende además cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 10 mM a
aproximadamente 50 mM.

68. Una composición que comprende:

Partículas de ARN lipoplejo que comprenden:

30 ARN que codifica un péptido o proteína que comprende al menos un epítipo,
al menos un lípido catiónico y al menos un lípido adicional,

donde la relación de cargas positivas a cargas negativas en las partículas lipoplejo de
ARN es de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1.9:2, o aproximadamente 1.3:2.0,

cloruro de sodio en una concentración de 0 mM a aproximadamente 40 mM, y un estabilizador.

69. La composición de cualquiera de las modalidades 64 a 68, en donde la composición comprende además un tampón.

5 70. La composición de una cualquiera de las modalidades 64 a 69, en donde la cantidad de ARN en la composición es de aproximadamente 0.01 mg/ml a aproximadamente 1 mg/ml, de aproximadamente 0.05 mg/ml a aproximadamente 0.5 mg/ml o de aproximadamente 0.05 mg/ml.

10 71. La composición de una cualquiera de las modalidades 67 a 70, en donde el cloruro de sodio está en una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 30 mM.

72. La composición de una cualquiera de las modalidades 67 a 71, en donde el cloruro de sodio está a una concentración de aproximadamente 20 mM.

73. La composición de una cualquiera de las modalidades 67 a 71, en donde el cloruro de sodio está a una concentración de aproximadamente 30 mM.

15 74. La composición de una cualquiera de las modalidades 64 a 73, en donde la concentración de estabilizador en la composición es mayor que el valor requerido para la osmolalidad fisiológica.

75. La composición de una cualquiera de las modalidades 64 a 74, en donde la concentración de estabilizador en la composición es de aproximadamente 5 a aproximadamente 35 peso por porcentaje de volumen (% p/v), o de aproximadamente 12.5 a aproximadamente 25 peso por porcentaje de volumen (% p/v).

25 76. La composición de una cualquiera de las modalidades 64 a 75, en donde el estabilizador es un carbohidrato seleccionado de un monosacárido, un disacárido, un trisacárido, un alcohol de azúcar, un oligosacárido o su alcohol de azúcar correspondiente y un polialcohol de cadena lineal.

77. La composición de cualquiera de las modalidades 64 a 76, donde el estabilizador es sacarosa a una concentración de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 por ciento en peso por volumen (% p/v).

30 78. La composición de la modalidad 77, en donde la sacarosa está en una concentración de aproximadamente el 15% (p/v) a aproximadamente el 25% (p/v).

79. La composición de la modalidad 77, en donde la sacarosa está en una concentración de aproximadamente el 20% (p/v) a aproximadamente el 25% (p/v).

80. La composición de la modalidad 77, en donde la sacarosa está en una concentración de aproximadamente 22% (p/v).
81. La composición de la modalidad 77, en donde la sacarosa está a una concentración de aproximadamente el 20% (p/v).
- 5 82. La composición de cualquiera de las modalidades 64 a 81, en donde la composición tiene un pH que es inferior al pH óptimo habitual para el almacenamiento de ARN.
83. La composición de cualquiera de las modalidades 64 a 82, en donde la composición tiene un pH de aproximadamente 5.7 a aproximadamente 6.7, o de aproximadamente 6.2.
84. La composición de una cualquiera de las modalidades 68 a 83, en donde el tampón es
- 10 ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il] etanosulfónico (HEPES).
85. La composición de la modalidad 84, en donde el HEPES está en una concentración de aproximadamente 2.5 mM a aproximadamente 10 mM, o de aproximadamente 7.5 mM.
86. La composición de cualquiera de las modalidades 64 a 85, donde la composición comprende además un agente quelante.
- 15 87. Una composición que comprende:
 Partículas de ARN lipoplejo que comprenden:
 ARN que codifica un péptido o proteína que comprende al menos un epítipo a una concentración de aproximadamente 0.05 mg/ml, y
 DOTMA y DOPE en una relación molar de aproximadamente 2:1,
 20 donde la relación de cargas positivas a cargas negativas en las partículas lipoplejo de ARN es de aproximadamente 1.3:2.0,
 cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 20 mM,
 sacarosa en una concentración de aproximadamente 22% (p/v),
 HEPES a una concentración de aproximadamente 7.5 mM con un pH de aproximadamente 6.2,
 25 y
 EDTA a una concentración de aproximadamente 2.5 mM.
88. La composición de una cualquiera de las modalidades 64 a 87, en donde la composición está en estado líquido o congelado.
89. La composición congelada de la modalidad 88, en donde la composición es estable a
- 30 una temperatura de aproximadamente -15°C a aproximadamente -40°C durante al menos un mes.
90. La composición congelada de la modalidad 88, en donde la composición es estable a una temperatura de aproximadamente -15°C durante al menos un mes.

91. La composición congelada de la modalidad 88, en donde la composición es estable a una temperatura de aproximadamente -15°C durante al menos dos meses.
92. La composición congelada de la modalidad 88, en donde la composición es estable a una temperatura de aproximadamente -20°C durante al menos un mes.
- 5 93. La composición congelada de la modalidad 88, en donde la composición es estable a una temperatura de aproximadamente -20°C durante al menos dos meses.
94. La composición congelada de la modalidad 88, en donde la composición es estable a una temperatura de aproximadamente -30°C durante al menos un mes.
95. La composición congelada de la modalidad 88, en donde la composición es estable a
10 una temperatura de aproximadamente -30°C durante al menos dos meses.
96. Una composición acuosa que comprende Partículas de ARN lipoplejo que se pueden obtener descongelando la composición congelada de una cualquiera de las modalidades 88 a 95 y ajustando opcionalmente la osmolalidad y la fuerza iónica añadiendo un líquido acuoso.
97. La composición de la modalidad 96, en donde la osmolalidad de la composición es de
15 aproximadamente 200 mOsmol/kg a aproximadamente 450 mOsmol/kg.
98. La composición de la modalidad 96 o 97, en donde la composición comprende cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 80 mM a aproximadamente 150 mM.
99. La composición de una cualquiera de las modalidades 64 a 98, en donde las partículas de ARN lipoplejo se pueden obtener mediante el método de una cualquiera de las modalidades
20 28 a 45.
100. La composición de una cualquiera de las modalidades 64 a 99, en donde las partículas de ARN lipoplejo se caracterizan por un único pico de Bragg a aproximadamente 1 nm^{-1} , donde el ancho del pico es menor que 0.2 nm^{-1}
101. La composición de una cualquiera de las modalidades 57 a 100, en donde las partículas
25 de ARN lipoplejo tienen un diámetro medio que varía de aproximadamente 200 a aproximadamente 800 nm, desde aproximadamente 250 hasta aproximadamente 700 nm, desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 600 nm, desde aproximadamente 300 nm hasta aproximadamente 500 nm, o desde aproximadamente 350 nm hasta aproximadamente 400 nm.
102. La composición de cualquiera de las modalidades 58 a 63, 65 a 86 y 88 a 101, en donde
30 el al menos un lípido catiónico comprende 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA) y/o 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP).

103. La composición de cualquiera de las modalidades 58 a 63, 65 a 86 y 88 a 102, donde el al menos un lípido adicional comprende 1.2-di-(9Z-octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), colesterol (Chol) y/o 1.2-dioleoil-sn-glicero-3- fosfocolina (DOPC).
- 5 104. La composición de cualquiera de las modalidades 58 a 63, 65 a 86 y 88 a 103, donde el al menos un lípido catiónico comprende 1.2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA) y el al menos un lípido adicional comprende 1.2-di- (9Z-octadecenoil) -sn-glicero-3 -fosfoetanolamina (DOPE).
- 10 105. La composición de cualquiera de las modalidades 58 a 63, 65 a 86 y 88 a 104, donde la relación molar del al menos un lípido catiónico al al menos un lípido adicional es de aproximadamente 10:0 a aproximadamente 1:9, de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2, de aproximadamente de 3:1 a aproximadamente 1:1, o aproximadamente 2:1.
- 15 106. La composición de cualquiera de las modalidades 58 a 63, 65 a 86 y 88 a 105, en donde el Partículas de ARN lipoplejo comprenden DOTMA y DOPE en un relación molar de aproximadamente 10:0 a 1:9, de aproximadamente 4:1 a 1:2, de aproximadamente de 3:1 a aproximadamente 1:1, o aproximadamente 2:1 y en donde la relación de carga de las cargas positivas en DOTMA a las cargas negativas en el ARN es de aproximadamente 1:2 a 1.9:2.
107. La composición de una cualquiera de las modalidades 63, 86 y 88 a 106, en donde el agente quelante es ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).
- 20 108. La composición de la modalidad 107, en donde el EDTA está en una concentración de aproximadamente 0.25 mM a aproximadamente 5 mM, o de aproximadamente 2.5 mM.
109. La composición de una cualquiera de las modalidades 57 a 108, que comprende además un adyuvante.
110. La composición de una cualquiera de las modalidades 57 a 109, que se formula para administración sistémica.
- 25 111. La composición de la modalidad 110, en donde la administración sistémica es por administración intravenosa.
112. La composición de una cualquiera de las modalidades 57 a 111 para uso terapéutico.
113. Un método para preparar una composición acuosa. que comprende Partículas de ARN lipoplejo que comprenden descongelar la composición congelada de una cualquiera de las
- 30 modalidades 88 a 112 y ajustar opcionalmente la osmolalidad y la fuerza iónica añadiendo un líquido acuoso.

114. El método de la modalidad 113, en donde se añade un líquido acuoso para obtener una osmolalidad de la composición de aproximadamente 200 mOsmol/kg a aproximadamente 450 mOsmol/kg.

115. El método de la modalidad 113 o 114, en donde se añade un líquido acuoso para
5 obtener cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 80 mM a
aproximadamente 150 mM.

Breve descripción de las Figuras

- Fig. 1** muestra la correlación entre la concentración de lípidos en la solución madre de lípidos y el tamaño de los liposomas. Los liposomas se prepararon mediante inyección de etanol en agua (no se realizó ningún proceso de filtración después de la inyección de etanol). El tamaño de los liposomas aumenta con la concentración de lípidos en etanol. Este ejemplo: mezcla de lípidos DOTMA/DOPE con un porcentaje molar de 66:33.
- Fig. 2** muestra la cantidad de partículas presentes en las formulaciones de liposomas DOTMA/DOPE preparadas con diferentes soluciones lipídicas a diferentes concentraciones.
- Fig. 3** muestra el impacto del tamaño del precursor de liposomas (coloide de liposoma no filtrado utilizado) en el tamaño de ARN-lipoplejo. Se obtuvieron pequeños lipoplejos de ARN cuando se utilizaron pequeños liposomas para su formación. No se encontró una correlación clara entre el tamaño de los liposomas y el tamaño del ARN-lipoplejo en todos los ARN-lipoplejo preparados con liposomas más grandes.
- Fig. 4** muestra la cantidad de partículas presentes en las formulaciones de ARN-lipoplejo preparadas con diferentes precursores de liposomas (liposomas no filtrados). La cantidad de partículas de 0.5 μm aumenta en las formulaciones de ARN-lipoplejo preparadas con liposomas más grandes. Los liposomas se prepararon mediante inyección de etanol utilizando diferentes soluciones madre de lípidos a diferentes concentraciones.
- Fig. 5** muestra curvas de difracción obtenidas a partir de mediciones SAXS de RNA-Lipoplejo formado con liposomas preparados a una relación de carga de 4/1 (arriba) y a una relación de carga de 1.3/2, donde los liposomas para la formación de lipoplejo se obtuvieron con una solución madre de lípidos mM en etanol de 400 mM, 300 mM y 100 mM.
- Fig. 6** muestra la longitud de correlación y la eficiencia de transfección in vitro (células dendríticas humanas) de diferentes lipoplejos de ARN preparados con diferentes precursores de liposomas. La actividad biológica (transfección de ARN in vitro) aumenta monótonamente con la longitud de correlación del ARN-lipoplejo. Los liposomas se prepararon mediante inyección de etanol y se prepararon diferentes soluciones madre de lípidos a diferentes concentraciones de lípidos.
- Fig. 7** muestra las mediciones de AF4 de lipoplejos de dos tipos diferentes de liposomas, fabricados a partir de una solución madre 150 mM en etanol, o de una solución madre 400 mM en etanol.

Fig. 8 muestra la eficacia de la transfección in vitro de diferentes ARN-lipoplejo en células dendríticas. La señal de luciferasa aumenta monótonamente con el tamaño del liposoma utilizado para la formación de ARN-lipoplejo.

Fig. 9 muestra la eficacia de la transfección in vitro de diferentes ARN-lipoplejo en células dendríticas. La señal de luciferasa aumenta monótonamente con el tamaño del liposoma.

Fig. 10 muestra eficacia de transfección in vivo de formulaciones de ARN-lipoplejo 6 h después de la aplicación. Se prepararon lipoplejos de ARN con liposomas pequeños y grandes (liposomas no filtrados). Los lipoplejos de ARN preparados con liposomas más grandes dan como resultado una mayor expresión de luciferasa.

Fig. 11 muestra imágenes in vivo de lipoplejos de ARN 6 h después de la aplicación. Se prepararon lipoplejos de ARN con liposomas grandes y pequeños. A) ARN-lipoplejo preparado con pequeños liposomas a partir de un coloide crudo. B) ARN-lipoplejo preparado con liposomas más grandes a partir de un coloide crudo. C) ARN-lipoplejo preparado con pequeños liposomas filtrados. D) ARN-lipoplejo preparado con grandes liposomas filtrados. Mayores señales de bioluminiscencia obtenidas con el ARN-lipoplejo preparado con liposomas más grandes.

Fig. 12 muestra el procedimiento general para la fabricación automatizada por lotes de lipoplejos de ARN.

Fig. 13 muestra el promedio Z y la polidispersidad de los lipoplejos de ARN que se preparan utilizando un elemento de mezcla de tipo Y con un diámetro interno de 3.2 mm a diferentes velocidades de flujo.

Fig. 14 muestra el promedio Z y la polidispersidad de los lipoplejos de ARN que se preparan utilizando un elemento de mezcla de tipo Y con un diámetro interno de 2.4 mm a diferentes velocidades de flujo.

Fig. 15 muestra la correlación del tamaño de partícula y la concentración de ARN en la formación de lipoplejo. La medición de PCS se realizó antes de la congelación.

Fig. 16 muestra la correlación de las características de las partículas y la concentración de ARN en la formación de lipoplejo después de tres ciclos de congelación y descongelación.

Fig. 17 muestra la correlación de las características de las partículas y la relación de carga (positiva: negativa) en el rango de 1.0: 2.0 a 2.1:2.0.

Fig. 18 muestra la correlación de las características de las partículas y la relación de carga (positiva: negativa) en el rango de 2.0: 1.0 a 5.0: 1.0.

Fig. 19 muestra la correlación de las características de las partículas y la concentración de NaCl en la formación de lipoplejo.

Fig. 20 muestra la correlación de la bioactividad y la concentración de NaCl en la formación de lipoplejo.

5 **Fig. 21** muestra las medidas de la integridad del ARN en el ARN_(LIP) composiciones sin crioprotector que utilizan diferentes sustancias tampón (HEPES; acetato de sodio; fosfato de sodio; carbonato de sodio) a varios valores de pH después de un almacenamiento acelerado a 40 °C. Las diferentes barras indican períodos de almacenamiento crecientes de izquierda (3 días) a derecha (21 días).

10 **Fig. 22** muestra mediciones de la integridad del ARN en formulaciones de ARN lipoplejo con sacarosa como crioprotector usando HEPES como sustancia tampón a varios valores de pH después de un almacenamiento acelerado a + 40 °C. Las diferentes barras indican períodos de almacenamiento crecientes de izquierda (1 día) a derecha (21 días).

15 **Fig. 23** muestra la integridad del ARN en lipoplejos almacenados a 40 °C con diferente contenido de EDTA.

Fig. 24 es un diagrama general que indica que la concentración de NaCl y crioprotector se optimizó en cada paso.

Fig. 25 muestra Z-promedio y polidispersidad de lipoplejos de ARN congelados en presencia de cantidades crecientes de crioprotectores alternativos.

20 **Fig. 26** muestra el número de partículas subvisibles $\geq 10 \mu\text{m}$ en formulaciones de ARN lipoplejo congeladas en presencia de cantidades crecientes de crioprotectores alternativos.

Fig. 27 muestra mediciones del tamaño de partícula en formulaciones de ARN lipoplejo que contienen sacarosa al 5-20% p/v (eje X) y varias concentraciones bajas de NaCl antes y después de congelar a -30 °C.

25 **Fig. 28** muestra medidas de tamaño de partícula en formulaciones de ARN lipoplejo que contienen 5-20% w/v trehalosa dihidrato (eje x) y varias concentraciones bajas de NaCl antes y después de congelar a -30 °C.

Fig. 29 muestra medidas de tamaño de partícula en formulaciones de ARN lipoplejo que contienen 50 mM de NaCl y varias cantidades (% p/v) de trehalosa dihidrato después de
30 múltiples ciclos de congelación y descongelación.

Fig. 30 muestra medidas del tamaño de partícula en formulaciones de ARN lipoplejo que contienen NaCl 70 mM y varias cantidades (% p/v) de trehalosa dihidrato después de múltiples ciclos de congelación y descongelación.

Fig. 31 muestra mediciones del tamaño de partícula en formulaciones de ARN lipoplejo que contienen NaCl 90 mM y varias cantidades (% p/v) de trehalosa dihidrato después de múltiples ciclos de congelación y descongelación.

Fig. 32 muestra las medidas del tamaño de partícula en formulaciones de ARN lipoplejo que contienen sacarosa al 5-20% p/v y varias concentraciones bajas de NaCl después del almacenamiento a -15 °C durante 8 meses. Las diferentes barras indican períodos de almacenamiento crecientes de izquierda (0 meses) a derecha (8 meses). En combinaciones de sacarosa/NaCl con menos de 8 bares, el tamaño de las partículas excedió las especificaciones en dos puntos de tiempo siguientes y se detuvo el análisis.

Fig. 33 muestra las mediciones del tamaño de partícula en formulaciones de ARN lipoplejo que contienen sacarosa al 5-20% p/v y varias concentraciones bajas de NaCl después del almacenamiento a -30 °C durante 8 meses. Las diferentes barras indican períodos de almacenamiento crecientes de izquierda (0 meses) a derecha (8 meses). En combinaciones de sacarosa/NaCl con menos de 8 bares, el tamaño de las partículas excedió las especificaciones en dos puntos de tiempo siguientes y se detuvo el análisis.

Fig. 34 muestra mediciones del tamaño de partícula en formulaciones de ARN lipoplejo que contienen 5-20% p/v de trehalosa dihidrato y varias concentraciones bajas de NaCl después de almacenamiento a -15 °C durante 8 meses. Las diferentes barras indican períodos de almacenamiento crecientes de izquierda (0 meses) a derecha (8 meses). En combinaciones de trehalosa/NaCl con menos de 8 bares, el tamaño de las partículas excedió las especificaciones en dos puntos de tiempo siguientes y se detuvo el análisis.

Fig. 35 muestra mediciones del tamaño de partícula en formulaciones de ARN lipoplejo que contienen 5-20% p/v de trehalosa dihidrato y varias concentraciones bajas de NaCl después de almacenamiento a -30 °C durante 8 meses. Las diferentes barras indican períodos de almacenamiento crecientes de izquierda (0 meses) a derecha (8 meses). En combinaciones de trehalosa/NaCl con menos de 8 bares, el tamaño de las partículas excedió las especificaciones en dos puntos de tiempo siguientes y se detuvo el análisis.

Fig. 36 muestra mediciones del tamaño de partícula en formulaciones de ARN lipoplejo que contienen 22% p/v de sacarosa y varias concentraciones bajas de NaCl después del almacenamiento a -20 °C.

Fig. 37 muestra mediciones del tamaño de partícula en formulaciones de ARN lipoplejo que contienen 22% p/v de trehalosa dihidrato y varias concentraciones bajas de NaCl después del almacenamiento a -20 °C.

Fig. 38 muestra mediciones del tamaño de partícula en formulaciones de ARN lipoplejo que contienen glucosa al 22% p/v y varias concentraciones bajas de NaCl después del almacenamiento a -20 °C.

Fig. 39 muestra mediciones del tamaño de partícula en formulaciones de ARN lipoplejo que contienen 22% p/v de sacarosa y NaCl 20 mM que se congelan y almacenan a una temperatura de -15 a -40 °C.

Fig. 40 muestra las mediciones del tamaño de partícula de los lipoplejos de ARN congelados en composiciones que contienen las combinaciones de crioprotectores enumerados en la Tabla 10 después del almacenamiento a -20°C.

Fig. 41 muestra el efecto de la concentración de trehalosa en las formulaciones de ARN lipoplejo [ARN(lip)] después de la congelación-descongelación o después del secado por congelación y reconstitución.

Fig. 42 muestra el cambio de tamaño de partícula en formulaciones de ARN(lip) secadas por congelación preparadas en trehalosa al 22% después de la reconstitución con una solución de NaCl al 0.9% o WFI (agua para inyección por sus siglas en inglés).

Fig. 43 muestra Transfección in vitro de Luc-RNA de formulaciones lipoplejo de RNA secadas por congelación [RNA (lip)] preparadas en trehalosa al 22% a diferentes concentraciones de NaCl. Las muestras secadas por congelación se reconstituyeron con una solución de NaCl al 0.9%. (columna texturizada: control de líquidos).

Fig. 44 muestra el diámetro Z-promedio de formulaciones lipoplejo de ARN secadas por congelación [ARN (lip)] formuladas a diferentes proporciones de trehalosa/NaCl almacenadas a 2-8°C o 25°C después de la reconstitución con solución de NaCl al 0.9%. Las formulaciones se reconstituyeron en el volumen original después del secado por congelación.

Fig. 45 muestra la integridad del ARN (% de ARN de longitud completa) del ARN secado por congelación (lip) formulado a diferentes proporciones de trehalosa/NaCl después de la reconstitución con una solución de NaCl al 0.9% y almacenado a 2-8 °C o 25 °C. Las formulaciones se reconstituyeron en el volumen original después del secado por congelación y se diluyeron 1:1 con una solución de NaCl al 0.9% para los experimentos de cultivo celular (0.01 mg/ml de ARN).

Fig. 46 representa las mediciones del tamaño de partícula de las composiciones de ARN lipoplejo que contienen diferentes sustancias tampón y pH después del almacenamiento en condiciones aceleradas (+25 °C). Las líneas de puntos representan los límites de especificación anticipados para el tamaño de partícula (límite superior: 700 nm, límite inferior: 250 nm).

Fig. 47 representa las mediciones de la polidispersidad de las composiciones de ARN lipoplejo que contienen diferentes sustancias tampón y pH después del almacenamiento en condiciones aceleradas (+25 °C). La línea de puntos representa el límite de especificación anticipado de 0.5 para el índice de polidispersidad.

5 **Fig. 48** representa las mediciones del pH de las composiciones de ARN lipoplejo que contienen diferentes sustancias tampón y pH después del almacenamiento en condiciones aceleradas (+25 °C).

Fig. 49 representa las mediciones de la integridad del ARN de las composiciones de ARN lipoplejo que contienen diferentes sustancias tampón y pH después del almacenamiento en
10 condiciones aceleradas (+25 °C). La línea de puntos representa el límite de especificación anticipado de $\geq 80\%$ de ARN integral de longitud completa.

Fig. 50 representa las mediciones del tamaño de partícula de las composiciones de ARN lipoplejo que contienen diferentes sustancias tampón y pH después del almacenamiento a -15 °C. Las líneas de puntos representan los límites de especificación anticipados para el tamaño
15 de partícula (límite superior: 700 nm, límite inferior: 250 nm).

Fig. 51 representa las mediciones de la polidispersidad de las composiciones de ARN lipoplejo que contienen diferentes sustancias tampón y pH después del almacenamiento a -15 °C. La línea de puntos representa el límite de especificación anticipado de 0.5 para el índice de polidispersidad. Además, puede verse que en presencia de concentraciones más bajas de NaCl,
20 las concentraciones más bajas de sacarosa son suficientes para estabilizar eficazmente las propiedades coloidales de los lipoplejos de ARN en estado congelado.

Fig. 52 representa las mediciones del pH de las composiciones de ARN lipoplejo que contienen diferentes sustancias tampón y pH después del almacenamiento a -15 °C.

Fig. 53 representa las mediciones de la integridad del ARN de las composiciones de ARN lipoplejo que contienen diferentes sustancias tampón y pH después del almacenamiento a -15 °C. La línea de puntos representa el límite de especificación anticipado de $\geq 80\%$ de ARN integral de longitud completa.
25

Fig. 54 representa las mediciones del tamaño de partícula de las composiciones de ARN lipoplejo que contienen diferentes sustancias tampón y pH después del almacenamiento en
30 condiciones aceleradas (+25 °C). Las líneas de puntos representan los límites de especificación anticipados para el tamaño de partícula (límite superior: 700 nm, límite inferior: 250 nm).

Fig. 55 representa las mediciones del índice de polidispersidad de las composiciones de ARN lipoplejo que contienen diferentes sustancias tampón y pH después del almacenamiento en

condiciones aceleradas (+25 °C). La línea de puntos representa el límite de especificación anticipado de 0.5 para el índice de polidispersidad.

Fig. 56 representa las mediciones del pH de las composiciones de ARN lipoplejo que contienen diferentes sustancias tampón y pH después del almacenamiento en condiciones aceleradas (+25 °C).

Fig. 57 representa las mediciones de la integridad del ARN de las composiciones de ARN lipoplejo que contienen diferentes sustancias tampón y pH después del almacenamiento en condiciones aceleradas (+25 °C). La línea de puntos representa el límite de especificación de $\geq 80\%$ de ARN integral de longitud completa.

Fig. 58 representa transiciones de tamaño de partícula de composiciones de ARN lipoplejo que contienen diferentes sustancias tampón y pH antes y después de la congelación. Las líneas de puntos representan los límites de especificación anticipados para el tamaño de partícula (límite superior: 700 nm, límite inferior: 250 nm).

Fig. 59 representa las mediciones del tamaño de partícula de las composiciones de ARN lipoplejo que contienen diferentes sustancias tampón y pH después del almacenamiento a -15 °C. Las líneas de puntos representan los límites de especificación anticipados para el tamaño de partícula (límite superior: 700 nm, límite inferior: 250 nm).

Fig. 60 representa las mediciones de la polidispersidad de las composiciones de ARN lipoplejo que contienen diferentes sustancias tampón y pH después del almacenamiento a -15 °C. La línea de puntos representa el límite de especificación anticipado de 0.5 para el índice de polidispersidad.

Fig. 61 representa las mediciones del pH de las composiciones de ARN lipoplejo que contienen diferentes sustancias tampón y pH después del almacenamiento a -15 °C.

Fig. 62 representa las mediciones de la integridad del ARN de las composiciones de ARN lipoplejo que contienen diferentes sustancias tampón y pH después del almacenamiento a -15 °C. La línea de puntos representa el límite de especificación anticipado de $\geq 80\%$ de ARN integral de longitud completa.

Fig. 63 representa las mediciones del tamaño de partícula de las composiciones de ARN lipoplejo que contienen diferentes concentraciones de tampón HEPES y pH después del almacenamiento en condiciones aceleradas (+25 °C). Las líneas de puntos representan los

límites de especificación anticipados para el tamaño de partícula (límite superior: 700 nm, límite inferior: 250 nm). El tamaño de partícula medido después de 50 días se considera un contorno.

Fig. 64 representa las mediciones del índice de polidispersidad de las composiciones de ARN lipoplejo que contienen diferentes concentraciones de tampón HEPES y pH después del almacenamiento en condiciones aceleradas (+25 °C). La línea de puntos representa el límite de especificación de 0.5 para el índice de polidispersidad.

Fig. 65 representa las mediciones del pH de las composiciones de ARN lipoplejo que contienen diferentes concentraciones de tampón HEPES y pH después del almacenamiento en condiciones aceleradas (+25 °C).

Fig. 66 representa las mediciones de la integridad del ARN de las composiciones de ARN lipoplejo que contienen diferentes concentraciones de tampón HEPES y pH después del almacenamiento en condiciones aceleradas (+25 °C). La línea de puntos representa el límite de especificación de $\geq 80\%$ de ARN integral de longitud completa.

Fig. 67 representa las mediciones del tamaño de partícula de las composiciones de ARN lipoplejo que contienen diferentes sustancias tampón y pH después del almacenamiento en condiciones aceleradas (+25 °C). Las líneas de puntos representan los límites de especificación anticipados para el tamaño de partícula (límite superior: 700 nm, límite inferior: 250 nm).

Fig. 68 representa las mediciones del índice de polidispersidad de las composiciones de ARN lipoplejo que contienen diferentes sustancias tampón y pH después del almacenamiento en condiciones aceleradas (+25 °C). La línea de puntos representa el límite de especificación anticipado de 0.5 para el índice de polidispersidad.

Fig. 69 representa las mediciones del pH de las composiciones de ARN lipoplejo que contienen diferentes sustancias tampón y pH después del almacenamiento en condiciones aceleradas (+25 °C).

FIG. 70 representa las mediciones de la integridad del ARN de las composiciones de ARN lipoplejo que contienen diferentes sustancias tampón y pH después del almacenamiento en condiciones aceleradas (+25 °C). La línea de puntos representa el límite de especificación anticipado de $\geq 80\%$ de ARN integral de longitud completa.

FIG. 71 representa transiciones de tamaño de partícula de composiciones de ARN lipoplejo que contienen concentraciones reducidas de sacarosa y NaCl antes y después de la congelación. Las líneas de puntos representan los límites de especificación anticipados para el tamaño de partícula (límite superior: 700 nm, límite inferior: 250 nm).

Descripción detallada

Aunque la presente divulgación se describe en detalle a continuación, debe entenderse que esta divulgación no se limita a las metodologías, protocolos y reactivos particulares descritos en el presente documento, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en este documento tiene el propósito de describir únicamente modalidades particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente divulgación que estará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por un experto en la técnica.

- 5
10 Preferiblemente, los términos usados en este documento se definen como se describe en "Un glosario multilingüe de términos biotecnológicos: (Recomendaciones de la IUPAC)", H.G.W Leuenberger, B. Nagel y H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza, (1995).

- 15 La práctica de la presente divulgación empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica, biología celular, inmunología y técnicas de ADN recombinante que se explican en la literatura en el campo (cf., por ejemplo, Clonación Molecular: Un manual de laboratorio, 2ª edición, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

- 20 A continuación, se describirán los elementos de la presente divulgación. Estos elementos se enumeran con modalidades específicas, sin embargo, debe entenderse que pueden combinarse de cualquier manera y en cualquier número para crear modalidades adicionales. Los ejemplos y modalidades descritos de diversas formas no deben interpretarse como que limitan la presente divulgación solo a las modalidades descritas explícitamente. Debe entenderse que esta descripción describe y engloba modalidades que combinan las modalidades descritas explícitamente con cualquier número de los elementos descritos. Además, cualquier permutaciones y combinaciones de todos los elementos descritos deben considerarse descritas por esta descripción a menos que el contexto indique lo contrario.

- 25 El término "aproximadamente" significa aproximadamente o casi, y en el contexto de un valor numérico o rango establecido aquí en una modalidad significa $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ o $\pm 3\%$ del valor numérico o rango mencionado o reclamado.

- 30 Los términos "un" y "una" y "el" y referencias similares utilizadas en el contexto de la descripción de la divulgación (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) deben interpretarse para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario

en el presente documento o claramente contradicho por el contexto. La recitación de rangos de valores en el presente documento está destinada simplemente a servir como un método abreviado de hacer referencia individualmente a cada valor separado que se encuentre dentro del rango. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, cada valor individual

5 se incorpora en la especificación como si se recitara individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que el contexto lo contradiga claramente de otro modo. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como"), proporcionado en el presente documento está destinado

10 simplemente a ilustrar mejor la divulgación y no supone una limitación en el alcance de las reivindicaciones. Ningún lenguaje en la especificación debe interpretarse como que indica algún elemento no reivindicado esencial para la práctica de la divulgación.

A menos que se especifique expresamente lo contrario, el término "que comprende" se usa en el contexto del presente documento para indicar que otros miembros pueden estar presentes

15 opcionalmente además de los miembros de la lista introducida por "que comprende". Sin embargo, se contempla como una modalidad específica de la presente divulgación que el término "que comprende" abarca la posibilidad de que no haya más miembros presentes, es decir, para el propósito de esta modalidad "que comprende" debe entenderse que tiene el significado de "que consiste en".

20 Se citan varios documentos a lo largo del texto de esta especificación. Cada uno de los documentos citados en este documento (incluidas todas las patentes, solicitudes de patente, publicaciones científicas, especificaciones del fabricante, instrucciones, etc.), ya sean supra o infra, se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Nada en este documento debe interpretarse como una admisión de que la presente divulgación no tenía derecho a ser anterior

25 a dicha divulgación.

Definiciones

A continuación, se proporcionarán definiciones que se aplican a todos los aspectos de la presente divulgación. Los siguientes términos tienen los siguientes significados a menos que se

30 indique lo contrario. Cualquier término indefinido tiene sus significados reconocidos en el arte. Términos tales como "reducir" o "inhibir" como se usan en este documento significan la capacidad de causar una disminución general, por ejemplo, de aproximadamente el 5% o más, aproximadamente el 10% o más, aproximadamente el 20% o más, aproximadamente el 50% o

más, o aproximadamente del 75% o más, en el nivel. El término "inhibir" o frases similares incluye una inhibición completa o esencialmente completa, es decir, una reducción a cero o esencialmente a cero.

Términos tales como "aumentar" o "mejorar" en una modalidad se refieren a un aumento o mejora en al menos aproximadamente un 10%, al menos aproximadamente un 20%, al menos aproximadamente un 30%, al menos aproximadamente un 40%, al menos aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente el 80%, o al menos aproximadamente el 100%.

"pH fisiológico", como se usa en este documento, se refiere a un pH de aproximadamente 7.5. Como se usa en la presente divulgación, "% p/v" se refiere al porcentaje de peso por volumen, que es una unidad de concentración que mide la cantidad de soluto en gramos (g) expresada como un porcentaje del volumen total de solución en mililitros (mL).

El término "fuerza iónica" se refiere a la relación matemática entre el número de diferentes tipos de especies iónicas en una solución particular y sus respectivas cargas. Por tanto, la fuerza iónica I está representada matemáticamente por la fórmula

$$I = \frac{1}{2} \cdot \sum_i z_i^2 \cdot c_i$$

donde c es la concentración molar de una especie iónica particular y z el valor absoluto de su carga. La suma Σ se toma sobre todos los diferentes tipos de iones (i) en solución.

Según la divulgación, el término "fuerza iónica" en una modalidad se refiere a la presencia de iones monovalentes. Con respecto a la presencia de iones divalentes, en particular cationes divalentes, su concentración o concentración efectiva (presencia de iones libres) debido a la presencia de agentes quelantes es en una modalidad suficientemente baja para evitar la degradación del ARN. En una modalidad, la concentración o concentración efectiva de iones divalentes está por debajo del nivel catalítico para la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster entre nucleótidos de ARN. En una modalidad, la concentración de iones divalentes libres es 20 μM o menos. En una modalidad, no hay iones divalentes libres o esencialmente no existen.

"Osmolalidad" se refiere a la concentración de un soluto particular expresada como el número de osmoles de soluto por kilogramo de solvente.

El número de Reynolds es un número adimensional, que se puede calcular utilizando el siguiente formalismo:

$$Re = \frac{\rho \cdot v \cdot l}{\eta}$$

donde ρ es la densidad del fluido, v es la velocidad del fluido, l es la longitud característica (aquí el diámetro interior del elemento de mezcla), y η es la viscosidad.

- 5 El término "congelación" se refiere a la solidificación de un líquido, normalmente con la eliminación del calor.

El término "liofilizando" o "liofilización" se refiere al secado por congelación de una sustancia congelándola y luego reduciendo la presión circundante para permitir que el medio congelado en la sustancia se sublima directamente de la fase sólida a la fase gaseosa.

- 10 El término "secado por atomización" se refiere al secado por atomización de una sustancia mezclando gas (calentado) con un fluido que se atomiza (atomizado) dentro de un recipiente (secador por atomización), donde el solvente de las gotitas formadas se evapora, dando lugar a un secado polvo.

El término "crioprotector" se refiere a una sustancia que se agrega a una formulación para

- 15 proteger los ingredientes activos durante las etapas de congelación.

El término "lioprotector" se refiere a una sustancia que se agrega a una formulación para proteger los ingredientes activos durante las etapas de secado.

El término "reconstituir" se refiere a la adición de un disolvente, como agua, a un producto seco para devolverlo a un estado líquido, como su estado líquido original.

- 20 El término "recombinante" en el contexto de la presente divulgación significa "elaborado mediante ingeniería genética". En una modalidad, un "objeto recombinante" en el contexto de la presente divulgación no se produce de forma natural.

El término "de origen natural", como se usa en el presente documento, se refiere al hecho de que un objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, un péptido o ácido nucleico que

25 está presente en un organismo (incluidos los virus) y que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificado intencionalmente por el hombre en el laboratorio es de origen natural. El término "encontrado en la naturaleza" significa "presente en la naturaleza" e incluye objetos conocidos, así como objetos que aún no han sido descubiertos y/o aislados de la naturaleza, pero que pueden ser descubiertos y/o aislados en el futuro de una fuente natural.

- 30 El término "solubilidad en equilibrio" se refiere a la concentración del soluto a la que la velocidad a la que el soluto se disuelve y la velocidad a la que el soluto se deposita fuera de la

solución son iguales. En una modalidad, el término se refiere a la concentración respectiva a temperatura ambiente.

Como se usa en este documento, el término "temperatura ambiente" se refiere a temperaturas superiores a 4 °C, preferiblemente de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 40 °C, de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 30 °C, de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 24 °C, o de aproximadamente 16 °C a aproximadamente 21 °C. Tales temperaturas incluirán 14 °C, 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C, 20 °C, 21 °C y 22 °C.

En el contexto de la presente divulgación, el término "partícula" se refiere a una entidad estructurada formada por moléculas o complejos de moléculas. En una modalidad, el término "partícula" se refiere a una estructura de tamaño micro o nano, tal como una estructura compacta de tamaño micro o nano.

En el contexto de la presente divulgación, el término "partícula lipoplejo de ARN" se refiere a una partícula que contiene lípidos, en particular lípidos catiónicos, y ARN. Las interacciones electrostáticas entre liposomas cargados positivamente y ARN cargado negativamente dan como resultado la complejación y la formación espontánea de partículas lipoplejo de ARN. Los liposomas cargados positivamente se pueden sintetizar generalmente usando un lípido catiónico, como DOTMA, y lípidos adicionales, como DOPE. En una modalidad, una partícula lipoplejo de ARN es una nanopartícula.

Como se usa en la presente divulgación, "nanopartícula" se refiere a una partícula que comprende ARN y al menos un lípido catiónico y que tiene un diámetro promedio adecuado para administración intravenosa.

El término "diámetro medio" se refiere al diámetro hidrodinámico medio de partículas medido por dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés) con análisis de datos utilizando el denominado algoritmo acumulativo, que proporciona como resultados el denominado Z_{promedio} con la dimensión de una longitud, y el índice de polidispersidad (PI por sus siglas en inglés), que es adimensional (Koppel, D., J. Chem. Phys. 57, 1972, págs.4814-4820, ISO 13321). Aquí, "diámetro medio", "diámetro" o "tamaño" de las partículas se utiliza como sinónimo de este valor de Z_{promedio} .

El término "índice de polidispersidad" se usa aquí como una medida de la distribución de tamaño de un conjunto de partículas, por ejemplo, nanopartículas. El índice de polidispersidad se calcula basándose en mediciones de dispersión dinámica de luz mediante el denominado análisis acumulativo.

Como se usa en este documento, "partículas subvisibles" se refiere a partículas que tienen un diámetro promedio menor de 100 micrómetros (μm). El número de partículas subvisibles se puede medir usando oscurecimiento de la luz para indicar el grado de agregación de las partículas lipoplejo de ARN en la presente descripción. En algunas modalidades, se mide el

5 número de partículas subvisibles que tienen un diámetro medio mayor o igual a 10 μm . En otras modalidades, se mide el número de partículas subvisibles que tienen un diámetro medio mayor o igual a 25 μm .

El término "técnica de inyección de etanol" se refiere a un proceso en donde una solución de etanol que comprende lípidos se inyecta rápidamente en una solución acuosa a través de una

10 aguja. Esta acción dispersa los lípidos por toda la solución y promueve la formación de estructuras lipídicas, por ejemplo la formación de vesículas lipídicas como la formación de liposomas. Generalmente, las partículas lipoplejo de ARN descritas en el presente documento se pueden obtener añadiendo ARN a una dispersión de liposomas coloidales. Usando la técnica de inyección de etanol, tal dispersión de liposomas coloidal se forma, en una modalidad, como

15 sigue: se inyecta una solución de etanol que comprende lípidos, tales como lípidos catiónicos como DOTMA y lípidos adicionales, en una solución acuosa con agitación. En una modalidad, las partículas lipoplejo de ARN descritas en el presente documento se pueden obtener sin una etapa de extrusión.

El término "extruir" o "extrusión" se refiere a la creación de partículas que tienen un perfil

20 transversal fijo. En particular, se refiere a la reducción de tamaño de una partícula, por lo que la partícula es forzada a pasar a través de filtros con poros definidos.

El término trehalosa siempre se refiere tanto a trehalosa anhidra como a trehalosa dihidrato. Todas las concentraciones de trehalosa se dan con respecto a la trehalosa dihidrato.

El término EDTA se refiere a la sal disódica del ácido etilendiaminotetracético. Todas las

25 concentraciones se dan con respecto a la sal disódica de EDTA.

Diámetro de partícula de ARN Lipoplejo

Las partículas de ARN lipoplejo descritas en este documento tienen un diámetro promedio que en una modalidad varía de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 1000 nm, de

30 aproximadamente 200 nm a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 250 a aproximadamente 700 nm, de aproximadamente 400 a aproximadamente 600 nm, de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 500 nm, o desde aproximadamente 350 nm a aproximadamente 400 nm. En modalidades específicas, las partículas de ARN lipoplejo tienen

un diámetro promedio de aproximadamente 200 nm, aproximadamente 225 nm, aproximadamente 250 nm, aproximadamente 275 nm, aproximadamente 300 nm, aproximadamente 325 nm, aproximadamente 350 nm, aproximadamente 375 nm, aproximadamente 400 nm, aproximadamente 425 nm, aproximadamente 450 nm, aproximadamente 475 nm, aproximadamente 500 nm, aproximadamente 525 nm, aproximadamente 550 nm, aproximadamente 575 nm, aproximadamente 600 nm, aproximadamente 625 nm, aproximadamente 650 nm, aproximadamente 700 nm, aproximadamente 725 nm, aproximadamente 750 nm, aproximadamente 775 nm, aproximadamente 800 nm, aproximadamente 825 nm, aproximadamente 850 nm, aproximadamente 875 nm, aproximadamente 900 nm, aproximadamente 925 nm, aproximadamente 950 nm, aproximadamente 975 nm o aproximadamente 1000 nm. En una modalidad, las partículas de ARN lipoplejo tienen un diámetro medio que varía de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 700 nm. En otra modalidad, las partículas lipoplejo de ARN tienen un diámetro medio que varía de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 500 nm. En una modalidad ejemplar, las partículas lipoplejo de ARN tienen un diámetro medio de aproximadamente 400 nm.

Las partículas de ARN lipoplejo descritas en el presente documento, por ejemplo, generadas por los procesos descritos en el presente documento, exhiben un índice de polidispersidad menor de aproximadamente 0.5, menor de aproximadamente 0.4 o menor de aproximadamente 0.3. A modo de ejemplo, las partículas lipoplejo de ARN pueden exhibir un índice de polidispersidad en un intervalo de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.3.

Lípido

En una modalidad, las soluciones lipídicas, los liposomas y las partículas lipoplejo de ARN descritas en el presente documento incluyen un lípido catiónico. Como se usa en este documento, un "lípido catiónico" se refiere a un lípido que tiene una carga neta positiva. Los lípidos catiónicos se unen al ARN cargado negativamente mediante interacción electrostática a la matriz lipídica. Generalmente, los lípidos catiónicos poseen un resto lipófilo, tal como un estero, una cadena de acilo o diacilo, y el grupo de cabeza del lípido típicamente lleva la carga positiva. Los ejemplos de lípidos catiónicos incluyen, pero no se limitan a, 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA), dimetildioctadecilamonio (DDAB); 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio propano (DOTAP); 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano (DODAP); Propanos de 1,2-diaciloxi-3-dimetilamonio; Propanos de 1,2-dialquiloxi-3-

dimetilamonio; cloruro de dioctadecildimetil amonio (DODAC), 2.3-di (tetradecoxi) propil- (2-hidroxi) -dimetilazanio (DMRIE), 1.2-dimiristoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (DMEPC), 1, 2-dimiristoil -3-trimetilamonio propano (DMTAP), bromuro de 1.2-dioleiloxipropil-3-dimetil-hidroxi) etil amonio (DORIE) y 2.3-dioleiloxi-N-[2(espermina carboxamida)etil]-N, N-dimetil- trifluoroacetato de l-propanamio (DOSPA). Se prefieren DOTMA, DOTAP, DODAC y DOSPA. En modalidades específicas, el al menos un lípido catiónico es DOTMA y/o DOTAP. En una modalidad, el al menos un lípido catiónico es DOTMA, en particular (R)-DOTMA.

Puede incorporarse un lípido adicional para ajustar la relación de carga global positiva a negativa y la estabilidad física de las partículas lipoplejo de ARN. En determinadas formas de modalidad, el lípido adicional es un lípido neutro. Como se usa en este documento, un "lípido neutro" se refiere a un lípido que tiene una carga neta de cero. Los ejemplos de lípidos neutros incluyen, pero no se limitan a, 1.2-di-(9Z-octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1.2-dioleil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidil etanol amina, ceramida, esfingoemielina, cefalina, colesterol y cerebrósido. En modalidades específicas, el segundo lípido es DOPE, colesterol y/o DOPC.

En determinadas modalidades, las partículas lipoplejo de ARN incluyen tanto un lípido catiónico como un lípido adicional. En una modalidad ejemplar, el lípido catiónico es DOTMA y el lípido adicional es DOPE. Sin desear estar obligado por la teoría, la cantidad del al menos un lípido catiónico en comparación con la cantidad del al menos un lípido adicional puede afectar las características importantes de las partículas de ARN lipoplejo, como la carga, el tamaño de las partículas, la estabilidad, la selectividad tisular y la bioactividad. del ARN. Por consiguiente, en algunas modalidades, la relación molar del al menos un lípido catiónico al al menos un lípido adicional es de aproximadamente 10:0 a aproximadamente 1:9, aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2 o aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:1. En modalidades específicas, la relación molar puede ser aproximadamente 3:1, aproximadamente 2.75: 1, aproximadamente 2.5: 1, aproximadamente 2.25: 1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 1.75: 1, aproximadamente 1.5: 1, aproximadamente 1.25: 1 o aproximadamente 1:1. En una modalidad ejemplar, la relación molar del al menos un lípido catiónico al al menos un lípido adicional es de aproximadamente 2:1.

ARN

En la presente divulgación, el término "ARN" se refiere a una molécula de ácido nucleico que incluye residuos de ribonucleótidos. En modalidades preferidas, el ARN contiene todos o la mayoría de los residuos de ribonucleótidos. Como se usa en este documento, "ribonucleótido" se refiere a un nucleótido con un grupo hidroxilo en la posición 2' de un grupo β -D-ribofuranosilo. El ARN incluye, sin limitación, ARN bicatenario, ARN monocatenario, ARN aislado como ARN parcialmente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético, ARN producido de manera recombinante, así como ARN modificado que se diferencia del ARN natural por la adición, delección o sustitución. y/o alteración de uno o más nucleótidos. Tales alteraciones pueden referirse a la adición de material no nucleotídico a los nucleótidos internos del ARN o al (los) extremo(s) del ARN. También se contempla en el presente documento que los nucleótidos en el ARN pueden ser nucleótidos no estándar, tales como nucleótidos o desoxinucleótidos sintetizados químicamente. Para la presente divulgación, estos ARN alterados se consideran análogos de ARN de origen natural.

En ciertas modalidades de la presente divulgación, el ARN es ARN mensajero (ARNm) que se relaciona con una transcripción de ARN que codifica un péptido o proteína. Como se establece en la técnica, el ARNm generalmente contiene una región no traducida 5' (5'-UTR por sus siglas en inglés), una región codificadora de péptidos y una región no traducida 3' (3'-UTR por sus siglas en inglés). En algunas modalidades, el ARN es producido por *in vitro* transcripción o síntesis química. En una modalidad, el ARNm es producido por *in vitro* transcripción usando una plantilla de ADN donde el ADN se refiere a un ácido nucleico que contiene desoxirribonucleótidos.

En una modalidad, el ARN es *in vitro* ARN transcrito (IVT-ARN) y puede obtenerse mediante *in vitro* transcripción de una plantilla de ADN apropiada. El promotor para controlar la transcripción puede ser cualquier promotor de cualquier ARN polimerasa. Una plantilla de ADN para *in vitro* La transcripción se puede obtener clonando un ácido nucleico, en particular ADNc, e introduciéndolo en un vector apropiado para *in vitro* transcripción. El ADNc puede obtenerse mediante transcripción inversa de ARN.

En ciertas modalidades de la presente divulgación, el ARN en las composiciones de ARN lipoplejo descritas en este documento está a una concentración de aproximadamente 0.01 mg/ml a aproximadamente 1 mg/ml, o de aproximadamente 0.05 mg/ml a aproximadamente 0.5 mg/ml. En modalidades específicas, el ARN está a una concentración de aproximadamente 0.01 mg/ml, aproximadamente 0.02 mg/ml, aproximadamente 0.03 mg/ml, aproximadamente 0.04 mg/ml, aproximadamente 0.05 mg/ml, aproximadamente 0.06 mg/ml, aproximadamente 0.07

mg./ml, aproximadamente 0.08 mg/ml, aproximadamente 0.09 mg/ml, aproximadamente 0.10 mg/ml, aproximadamente 0.11 mg/ml, aproximadamente 0.12 mg/ml, aproximadamente 0.13 mg/ml, aproximadamente 0.14 mg/ml, aproximadamente 0.15 mg/ml, aproximadamente 0.16 mg/ml, aproximadamente 0.17 mg/ml, aproximadamente 0.18 mg/ml, aproximadamente 0.19 mg/ml, aproximadamente 0.20 mg/ml, aproximadamente 0.21 mg/ml, aproximadamente 0.22 mg/ml, aproximadamente 0.23 mg/ml, aproximadamente 0.24 mg/ml, aproximadamente 0.25 mg/ml, aproximadamente 0.26 mg/ml, aproximadamente 0.27 mg/ml, aproximadamente 0.28 mg/ml, aproximadamente 0.29 mg/ml, aproximadamente 0.30 mg/ml, aproximadamente 0.31 mg/ml, aproximadamente 0.32 mg/ml, aproximadamente 0.33 mg/ml, aproximadamente 0.34 mg/ml, aproximadamente 0.35 mg/ml, aproximadamente 0.36 mg/ml, aproximadamente 0.37 mg/ml, aproximadamente 0.38 mg/ml, aproximadamente 0.39 mg/ml, aproximadamente 0.40 mg/ml, aproximadamente 0.41 mg/ml, aproximadamente 0.42 mg/ml, aproximadamente 0.43 mg/ml, aproximadamente 0.44 mg/ml, aproximadamente 0.45 mg/ml, aproximadamente 0.46 mg/ml, aproximadamente 0.47 mg/ml, aproximadamente 0.48 mg/ml, aproximadamente 0.49 mg/ml o aproximadamente 0.50 mg/ml. En una modalidad ejemplar, el ARN está a una concentración de aproximadamente 0.02 mg/ml o aproximadamente 0.05 mg/ml.

En una modalidad, el ARN puede tener ribonucleótidos modificados. Los ejemplos de ribonucleótidos modificados incluyen, sin limitación, 5-metilcitidina y pseudouridina.

En algunas modalidades, el ARN de acuerdo con la presente divulgación comprende una caperuza 5'. En una modalidad, el ARN de la presente divulgación no tiene 5'-trifosfatos sin caperuza. En una modalidad, el ARN puede modificarse mediante un análogo de caperuza 5'. El término "caperuza 5'" se refiere a una estructura que se encuentra en el extremo 5' de una molécula de ARNm y generalmente consiste en un nucleótido de guanosina conectado al ARNm mediante un enlace trifosfato 5' a 5'. En una modalidad, esta guanosina está metilada en la posición 7. Proporcionar un ARN con una caperuza 5' o análogo de caperuza 5' se puede lograr mediante transcripción *in vitro*, en donde la caperuza 5' se expresa cotranscripcionalmente en la hebra de ARN, o se puede unir a ARN postranscripcionalmente usando enzimas de terminación.

En algunas modalidades, el ARN de acuerdo con la presente divulgación comprende una 5'-UTR y/o una 3'-UTR. El término "región no traducida" o "UTR" se refiere a una región en una molécula de ADN que se transcribe, pero no se traduce en una secuencia de aminoácidos, o a la región correspondiente en una molécula de ARN, tal como una molécula de ARNm. Una región no traducida (UTR) puede estar presente 5' (aguas arriba) de un marco de lectura abierto

(5'-UTR) y/o 3' (aguas abajo) de un marco de lectura abierto (3'-UTR). Un 5'-UTR, si está presente, está ubicado en el extremo 5', aguas arriba del codón de inicio de una región que codifica una proteína. Un 5'-UTR está aguas debajo de la caperuza 5' (si está presente), por ejemplo, directamente adyacente a la caperuza 5'. Un 3'-UTR, si está presente, está ubicado en el extremo 3', aguas abajo del codón de terminación de una región que codifica una proteína, pero el término "3'-UTR" preferiblemente no incluye la cola poli (A). Por tanto, el 3'-UTR está aguas arriba de la secuencia poli (A) (si está presente), por ejemplo, directamente adyacente a la secuencia poli (A).

En algunas modalidades, el ARN según la presente divulgación comprende una secuencia 3'-poli (A). El término "secuencia poli(A)" se refiere a una secuencia de residuos de adenilo (A) que normalmente se encuentra en el extremo 3' de una molécula de ARN. Según la divulgación, en una modalidad, una secuencia de poli(A) comprende al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 80, o al menos aproximadamente 100, y hasta aproximadamente 500, hasta aproximadamente 400, hasta aproximadamente 300, hasta aproximadamente 200 o hasta aproximadamente 150 nucleótidos A, y en particular aproximadamente 120 nucleótidos A.

En el contexto de la presente divulgación, el término "transcripción" se refiere a un proceso, en donde el código genético en una secuencia de ADN se transcribe en ARN. Posteriormente, el ARN puede traducirse en péptido o proteína.

Con respecto al ARN, el término "expresión" o "traducción" se relaciona con el proceso en los ribosomas de una célula mediante el cual una hebra de ARNm dirige el ensamblaje de una secuencia de aminoácidos para producir un péptido o una proteína.

En una modalidad, después de la administración de las partículas lipoplejo de ARN descritas en el presente documento, al menos una parte del ARN se administra a una célula diana. En una modalidad, al menos una parte del ARN se administra al citosol de la célula diana. En una modalidad, el ARN es ARN que codifica un péptido o proteína y la célula diana traduce el ARN para producir el péptido o proteína. En una modalidad, la célula diana es una célula del bazo. En una modalidad, la célula diana es una célula presentadora de antígeno tal como una célula presentadora de antígeno profesional en el bazo. En una modalidad, la célula diana es una célula dendrítica en el bazo. Por tanto, las partículas de lipoplejo de ARN descritas en el presente documento pueden usarse para administrar ARN a dicha célula diana. Por consiguiente, la presente divulgación también se refiere a un método para administrar ARN a una célula diana en un sujeto que comprende la administración de las partículas lipoplejo de ARN descritas en

el presente documento al sujeto. En una modalidad, el ARN se administra al citosol de la célula diana. En una modalidad, el ARN es ARN que codifica un péptido o proteína y la célula diana traduce el ARN para producir el péptido o proteína.

En una modalidad, el ARN codifica un péptido o proteína farmacéuticamente activo.

- 5 Según la divulgación, el término "El ARN codifica" significa que el ARN, si está presente en el entorno apropiado, como dentro de las células de un tejido diana, puede dirigir el ensamblaje de aminoácidos para producir el péptido o proteína que codifica durante el proceso de traducción. En una modalidad, El ARN puede interactuar con la maquinaria de traducción celular permitiendo la traducción del péptido o proteína. Una célula puede producir el péptido
10 o la proteína codificados de forma intracelular (por ejemplo, en el citoplasma y/o en el núcleo), puede secretar el péptido o la proteína codificados, o puede producirlo en la superficie.

- Según la divulgación, el término "péptido" comprende oligo y polipéptidos y se refiere a sustancias que comprenden aproximadamente dos o más, aproximadamente 3 o más, aproximadamente 4 o más, aproximadamente 6 o más, aproximadamente 8 o más,
15 aproximadamente 10 o más, aproximadamente 13 o más, aproximadamente 16 o más, aproximadamente 20 o más, y hasta aproximadamente 50, aproximadamente 100 o aproximadamente 150, aminoácidos consecutivos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. El término "proteína" se refiere a péptidos grandes, en particular péptidos que tienen al menos aproximadamente 151 aminoácidos, pero los términos "péptido" y "proteína" se usan aquí
20 normalmente como sinónimos.

- Un "péptido o proteína farmacéuticamente activo" tiene un efecto positivo o ventajoso sobre una condición o estado de enfermedad de un sujeto cuando se proporciona al sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz. En una modalidad, un péptido o proteína farmacéuticamente activo tiene propiedades curativas o paliativas y se puede administrar para mejorar, aliviar,
25 aliviar, revertir, retrasar el inicio o disminuir la gravedad de uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno. Un péptido o proteína farmacéuticamente activo puede tener propiedades profilácticas y puede usarse para retrasar la aparición de una enfermedad o para disminuir la gravedad de dicha enfermedad o condición patológica. El término "péptido o proteína farmacéuticamente activo" incluye proteínas o polipéptidos completos, y también
30 puede referirse a fragmentos farmacéuticamente activos de los mismos. También puede incluir análogos farmacéuticamente activos de un péptido o proteína.

Ejemplos de proteínas farmacéuticamente activas incluyen, pero no se limitan a, citocinas y proteínas del sistema inmunológico tales como compuestos inmunológicamente activos (por

ejemplo, interleucinas, factor estimulante de colonias (CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos factor (GM-CSF), eritropoyetina, factor de necrosis tumoral (TNF), interferones, integrinas, direccioninas, seletinas, receptores homing, receptores de células T, inmunoglobulinas, antígenos solubles del
5 complejo principal de histocompatibilidad, antígenos inmunológicamente activos como bacterianos, parasitarios o virales antígenos, alérgenos, autoantígenos, anticuerpos), hormonas (insulina, hormona tiroidea, catecolaminas, gonadotrofinas, hormonas tróficas, prolactina, oxitocina, dopamina, somatotropina bovina, leptinas y similares), hormonas de crecimiento (p. ej., hormona de crecimiento humano), factores de crecimiento (p. ej., factor de crecimiento
10 epidérmico, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento similar a la insulina y similares), receptores del factor de crecimiento, enzimas (activador de plasminógeno tisular, estreptoquinasa, colesterol biosintético o degradante, enzimas esteriodogénicas, quinasas, fosfodiesterasas, metilasas, desmetilasas, deshidrogenasas, celulasas, proteasas, lipasas, fosfolipasas, aromatasas, citocromos, adenilato o guanilato ciclasas y receptores de esteroides,
15 neuramididasas receptores de hormonas, receptores de péptidos), proteínas de unión (proteínas de unión a la hormona del crecimiento o factor de crecimiento y similares), factores de transcripción y traducción, proteínas supresoras del crecimiento tumoral (p. ej., proteínas que inhiben la angiogénesis), proteínas estructurales (como colágeno, fibroína, fibrinógeno, elastina, tubulina, actina y miosina), proteínas sanguíneas (trombina, albúmina sérica, factor
20 VII, factor VIII, insulina, factor IX, factor X, activador del plasminógeno tisular, proteína C, factor von Willebrand, antitrombina III, glucocerebrosidasa, eritropoyetina factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) o factor VIII modificado, anticoagulantes y similares.

El término "compuesto inmunológicamente activo" se refiere a cualquier compuesto que altere una respuesta inmunitaria, por ejemplo, induciendo y/o suprimiendo la maduración de las
25 células inmunitarias, induciendo y/o suprimiendo la biosíntesis de citoquinas y/o alterando la inmunidad humoral estimulando la producción de anticuerpos por B células. Los compuestos inmunológicamente activos poseen una potente actividad inmunoestimulante que incluye, entre otros, actividad antiviral y antitumoral, y también pueden regular negativamente otros aspectos de la respuesta inmune, por ejemplo, alejando la respuesta inmune de una respuesta inmune
30 TH2, que es útil para tratar una amplia gama de enfermedades mediadas por TH2. Los compuestos inmunológicamente activos pueden ser útiles como adyuvantes de vacunas.

En una modalidad, un péptido o proteína farmacéuticamente activo comprende uno o más antígenos o uno o más epítopos, es decir, la administración del péptido o proteína a un sujeto

provoca una respuesta inmune contra uno o más antígenos o uno o más epítomos en un sujeto. que puede ser terapéutico o protector parcial o total.

El término "antígeno" se refiere a un agente que comprende un epítomo contra el cual se puede generar una respuesta inmune. El término "antígeno" incluye, en particular, proteínas y péptidos. En una modalidad, las células del sistema inmunitario presentan un antígeno, como las células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas o los macrófagos. En una modalidad, un antígeno o un producto de procesamiento del mismo, como un epítomo de células T, está unido por un receptor de células T o B, o por una molécula de inmunoglobulina, como un anticuerpo. Por consiguiente, un antígeno o un producto de procesamiento del mismo puede reaccionar específicamente con anticuerpos o linfocitos T (células T). En una modalidad, un antígeno es un antígeno asociado a una enfermedad, tal como un antígeno tumoral, un antígeno viral o un antígeno bacteriano y un epítomo se deriva de dicho antígeno.

El término "antígeno asociado a una enfermedad" se usa en su sentido más amplio para referirse a cualquier antígeno asociado con una enfermedad. Un antígeno asociado a una enfermedad es una molécula que contiene epítomos que estimularán el sistema inmunológico de un huésped para producir una respuesta inmune específica del antígeno celular y/o una respuesta de anticuerpos humorales contra la enfermedad. Por tanto, el antígeno asociado a la enfermedad o un epítomo del mismo puede usarse con fines terapéuticos. Los antígenos asociados a enfermedades pueden estar asociados con infección por microbios, típicamente antígenos microbianos, o asociados con cáncer, típicamente tumores.

El término "antígeno tumoral" se refiere a un componente de las células cancerosas que puede derivar del citoplasma, la superficie celular y el núcleo celular. En particular, se refiere a aquellos antígenos que se producen intracelularmente o como antígenos de superficie en células tumorales.

El término "antígeno viral" se refiere a cualquier componente viral que tenga propiedades antigénicas, es decir, que pueda provocar una respuesta inmune en un individuo. El antígeno viral puede ser una ribonucleoproteína viral o una proteína de la envoltura.

El término "antígeno bacteriano" se refiere a cualquier componente bacteriano que tenga propiedades antigénicas, es decir, que pueda provocar una respuesta inmune en un individuo.

El antígeno bacteriano puede derivarse de la pared celular o la membrana del citoplasma de la bacteria.

El término "epítomo" se refiere a una parte o fragmento de una molécula tal como un antígeno que es reconocido por el sistema inmunológico. Por ejemplo, el epítomo puede ser reconocido

por células T, células B o anticuerpos. Un epítipo de un antígeno puede incluir una porción continua o discontinua del antígeno y puede tener entre aproximadamente 5 y aproximadamente 100 aminoácidos de longitud. En una modalidad, un epítipo tiene una longitud de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 25 aminoácidos. El término "epítipo" incluye

5 epítipos de células T.

El término "epítipo de células T" se refiere a una parte o fragmento de una proteína que es reconocida por una célula T cuando se presenta en el contexto de moléculas MHC (por sus siglas en inglés). El término "complejo mayor de histocompatibilidad" y la abreviatura "MHC" incluye moléculas de MHC de clase I y MHC de clase II y se refiere a un complejo de genes

10 que está presente en todos los vertebrados. Las proteínas o moléculas de MHC son importantes para la señalización entre linfocitos y células presentadoras de antígenos o células enfermas en reacciones inmunes, en las que las proteínas o moléculas de MHC se unen a epítipos de péptidos y los presentan para su reconocimiento por receptores de células T en células T. Las proteínas codificadas por el MHC se expresan en la superficie de las células y presentan tanto

15 autoantígenos (fragmentos de péptidos de la propia célula) como no autoantígenos (p. Ej., Fragmentos de microorganismos invasores) a una célula T. En el caso de complejos de péptido/MHC de clase I, los péptidos de unión tienen típicamente una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 10 aminoácidos, aunque los péptidos más largos o más cortos pueden ser eficaces. En el caso de complejos de MHC/péptido de clase II, los péptidos

20 de unión tienen típicamente una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 aminoácidos y en particular tienen una longitud de aproximadamente 13 a aproximadamente 18 aminoácidos, mientras que los péptidos más largos y más cortos pueden ser eficaces.

En determinadas modalidades de la presente divulgación, el ARN codifica al menos un epítipo. En determinadas formas de modalidad, el epítipo se deriva de un antígeno tumoral. El antígeno

25 tumoral puede ser un antígeno "estándar", que generalmente se sabe que se expresa en varios cánceres. El antígeno tumoral también puede ser un "neoantígeno", que es específico del tumor de un individuo y no ha sido reconocido previamente por el sistema inmunológico. Un neoantígeno o un neoepítipo puede resultar de una o más mutaciones específicas del cáncer en el genoma de las células cancerosas que dan lugar a cambios de aminoácidos. Los ejemplos de

30 antígenos tumorales incluyen, sin limitación, p53, ART-4, BAGE, beta-catenina/m, Bcr-abL CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, las proteínas de la superficie celular de la familia de las claudinas, como CLAUD FN-6, CLAUDIN-18.2 y CLAUDIN-12, c-MYC, CT, Cyp-B, DAM, ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gap 100, HAGE , HER-

2/neu, HPV-E7, HPV-E6, HAST-2, hTERT (o hTRT), LAGE, LDLR/FUT, MAGE-A, preferiblemente MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11 o MAGE-A12, MAGE-B, MAGE-C, MART-1/Melan-A, MC1R, Miosina/m, MUC1, MUM-1, MUM-2, MUM-3, NA88-A, NF1, NY-ESO-1, NY-BR-1, p190 menor BCR-abL, Pml/RARa, PRAME, proteinasa 3, PSA, PSM, RAGE, RU1 o RU2, SAGE, SART-1 o SART-3, SCGB3A2, SCP1, SCP2, SCP3, SSX, SURVIVIN, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, TPTE, WT y WT-1.

Las mutaciones del cáncer varían con cada individuo. Por tanto, las mutaciones del cáncer que codifican nuevos epítomos (neoepítomos) representan dianas atractivas en el desarrollo de composiciones de vacunas e inmunoterapias. La eficacia de la inmunoterapia tumoral se basa en la selección de antígenos y epítomos específicos del cáncer capaces de inducir una potente respuesta inmune dentro de un huésped. El ARN se puede usar para administrar epítomos tumorales específicos del paciente a un paciente. Las células dendríticas (DC) que residen en el bazo representan células presentadoras de antígenos de particular interés para la expresión de ARN de epítomos o antígenos inmunogénicos tales como epítomos tumorales. Se ha demostrado que el uso de múltiples epítomos promueve la eficacia terapéutica en las composiciones de vacunas tumorales. La secuenciación rápida del mutanoma tumoral puede proporcionar múltiples epítomos para vacunas individualizadas que pueden ser codificadas por el ARN descrito en el presente documento, por ejemplo, como un único polipéptido en donde los epítomos están opcionalmente separados por enlazadores. En ciertas modalidades de la presente divulgación, el ARN codifica al menos un epítomo, al menos dos epítomos, al menos tres epítomos, al menos cuatro epítomos, al menos cinco epítomos, al menos seis epítomos, al menos siete epítomos, al menos ocho epítomos, al menos nueve epítomos, o al menos diez epítomos. Las modalidades ejemplares incluyen ARN que codifica al menos cinco epítomos (denominado "pentatopo") y ARN que codifica al menos diez epítomos (denominado "decatopo").

Relación de carga

La carga eléctrica de las partículas lipoplejo de ARN de la presente divulgación es la suma de las cargas eléctricas presentes en al menos un lípido catiónico y las cargas eléctricas presentes en el ARN. La relación de carga es la relación entre las cargas positivas presentes en el al menos un lípido catiónico y las cargas negativas presentes en el ARN. La relación de carga de las cargas positivas presentes en el al menos un lípido catiónico a las cargas negativas presentes en el ARN se calcula mediante la siguiente ecuación: relación de carga = [(concentración de lípidos

cationicos (mol)) * (el número total de cargas positivas en el lípido catiónico)]/[(concentración de ARN (mol)) * (el número total de cargas negativas en el ARN)]. La concentración de ARN y la al menos una cantidad de lípidos catiónicos se pueden determinar usando métodos de rutina por un experto en la técnica.

- 5 En una primera modalidad, a pH fisiológico, la relación de carga de cargas positivas a cargas negativas en las partículas lipoplejo de ARN es de aproximadamente 1.9:2 a aproximadamente 1:2. En modalidades específicas, la relación de carga de cargas positivas a cargas negativas en las partículas de ARN lipoplejo a pH fisiológico es aproximadamente 1.9:2.0, aproximadamente 1.8:2.0, aproximadamente 1.7:2.0, aproximadamente 1.6:2.0,
- 10 aproximadamente 1.5:2.0, aproximadamente 1.4:2.0, aproximadamente 1.3:2.0, aproximadamente 1.2:2.0, aproximadamente 1.1:2.0 o aproximadamente 1:2.0. En una modalidad, la relación de carga de cargas positivas a cargas negativas en las partículas de ARN lipoplejo a pH fisiológico es 1.3:2.0. En otra modalidad, las partículas de ARN lipoplejo descritas en este documento pueden tener un número igual de cargas positivas y negativas a pH
- 15 fisiológico, produciendo partículas de ARN lipoplejo con una relación neta de carga neutra. En una segunda modalidad, a pH fisiológico, la relación de carga de cargas positivas a cargas negativas en las partículas lipoplejo de ARN es de aproximadamente 6:1 a aproximadamente 1.5:1. En modalidades específicas, la relación de carga de cargas positivas a cargas negativas en las partículas de ARN lipoplejo a pH fisiológico es aproximadamente 6.0:1.0,
- 20 aproximadamente 5.9:1.0, aproximadamente 5.8:1.0, aproximadamente 5.7:1.0, aproximadamente 5.6:1.0, aproximadamente 5.5:1.0, aproximadamente 5.4:1.0, aproximadamente 5.3:1.0, aproximadamente 5.2:1.0, aproximadamente 5.1:1.0, aproximadamente 5.0:1.0, aproximadamente 4.9:1.0, aproximadamente 4.8:1.0, aproximadamente 4.7:1.0, aproximadamente 4.6:1.0, aproximadamente 4.5:1.0,
- 25 aproximadamente 4.4:1.0, aproximadamente 4.3:1.0, aproximadamente 4.2:1.0, aproximadamente 4.1:1.0, aproximadamente 4.0:1.0, aproximadamente 3.9:1.0, aproximadamente 3.8:1.0, aproximadamente 3.7:1.0, aproximadamente 3.6:1.0, aproximadamente 3.5:1.0, aproximadamente 3.4:1.0, aproximadamente 3.3:1.0, aproximadamente 3.2:1.0, aproximadamente 3.1:1.0, aproximadamente 3.0:1.0,
- 30 aproximadamente 2.9:1.0, aproximadamente 2.8:1.0, aproximadamente 2.7:1.0, aproximadamente 2.6:1.0, aproximadamente 2.5:1.0, aproximadamente 2.4:1.0, aproximadamente 2.3:1.0, aproximadamente 2.2:1.0, aproximadamente 2.1:1.0,

aproximadamente 2.0:1.0, aproximadamente 1.9:1.0, aproximadamente 1.8:1.0, aproximadamente 1.7:1.0, aproximadamente 1.6:1.0 o aproximadamente 1.5 :1.0.

Para la inmunoterapia basada en ARN, es necesario dirigirse a órganos precisos, como el bazo, para evitar una respuesta autoinmune en otros órganos y una posible toxicidad. Según la divulgación, el ARN puede dirigirse a diferentes células, tejidos u órganos.

Se ha encontrado que las partículas lipoplejo de ARN que tienen una relación de carga de acuerdo con la primera modalidad pueden usarse para apuntar preferentemente a tejido del bazo o células del bazo tales como células presentadoras de antígenos, en particular células dendríticas. Por consiguiente, en una modalidad, tras la administración de las partículas lipoplejo de ARN, se produce la acumulación de ARN y/o la expresión de ARN en el bazo. Por tanto, las partículas lipoplejo de ARN de la divulgación pueden usarse para expresar ARN en el bazo. En una modalidad, después de la administración de las partículas lipoplejo de ARN, no se produce acumulación de ARN y/o expresión de ARN en el pulmón y/o el hígado o esencialmente no se produce ninguna acumulación de ARN. En una modalidad, después de la administración de las partículas de ARN lipoplejo, se produce la acumulación de ARN y/o la expresión de ARN en células presentadoras de antígenos, tales como células presentadoras de antígenos profesionales en el bazo. Por tanto, las partículas lipoplejo de ARN de la divulgación pueden usarse para expresar ARN en tales células presentadoras de antígenos. En una modalidad, las células presentadoras de antígeno son células dendríticas y/o macrófagos.

Se ha descubierto que las partículas lipoplejo de ARN que tienen una relación de carga según la segunda modalidad pueden usarse para dirigirse preferentemente al tejido pulmonar o las células pulmonares. Por consiguiente, en una modalidad, después de la administración de las partículas lipoplejo de ARN, se produce la acumulación de ARN y/o la expresión de ARN en el pulmón. Por tanto, las partículas lipoplejo de ARN de la divulgación pueden usarse para expresar ARN en el pulmón. En consecuencia, si se desea la expresión de ARN en tejido distinto del bazo, en las modalidades descritas en el presente documento en relación con una relación de carga según la primera modalidad, por ejemplo, una relación de carga de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1.9:2, una relación de carga según a la segunda modalidad, por ejemplo, se puede usar una relación de carga de aproximadamente 6:1 a aproximadamente 1.5:1, en lugar de la relación de carga según la primera modalidad. En estas y otras modalidades descritas en el presente documento, ARN distinto del ARN que codifica un péptido o proteína que comprende al menos un epítipo, por ejemplo, ARN que codifica un péptido o proteína farmacéuticamente activo como se describe en el presente documento. En una modalidad, el

péptido o proteína farmacéuticamente activo es una citoquina y/o se pretende el tratamiento del cáncer de pulmón.

Composiciones que comprenden partículas de ARN Lipoplejo

5 **A. Sal y fuerza iónica**

Según la presente divulgación, las composiciones descritas en el presente documento pueden comprender sales tales como cloruro de sodio. Sin desear estar obligado por la teoría, el cloruro de sodio funciona como un agente de osmolalidad iónica para precondicionar el ARN antes de mezclarlo con el al menos un lípido catiónico. Ciertas modalidades contemplan sales orgánicas o inorgánicas alternativas al cloruro de sodio en la presente divulgación. Las sales alternativas incluyen, sin limitación, cloruro de potasio, fosfato dipotásico, fosfato monopotásico, acetato de potasio, bicarbonato de potasio, sulfato de potasio, acetato de potasio, fosfato de disodio, fosfato de monosodio, acetato de sodio, bicarbonato de sodio, sulfato de sodio, acetato de sodio, cloruro de litio, magnesio. cloruro, fosfato de magnesio, cloruro de calcio y sales de sodio del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Generalmente, las composiciones que comprenden partículas lipoplejo de ARN descritas en este documento comprenden cloruro de sodio en una concentración que preferiblemente va desde 0 mM a aproximadamente 500 mM, desde aproximadamente 5 mM a aproximadamente 400 mM, o desde aproximadamente 10 mM hasta aproximadamente 300 mM. En una modalidad, composiciones que comprenden partículas de ARN lipoplejo comprenden una fuerza iónica correspondiente a tales concentraciones de cloruro de sodio.

Generalmente, las composiciones para y resultantes de la formación de partículas lipoplejo de ARN a partir de ARN y liposomas tales como los descritos en este documento comprenden una alta concentraciones de cloruro de sodio, o comprende una alta fuerza iónica. En una modalidad, el cloruro de sodio está a una concentración de al menos 45 mM. En una modalidad, el cloruro de sodio está a una concentración de aproximadamente 45 mM a aproximadamente 300 mM, o de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM. En una modalidad, las composiciones comprenden una fuerza iónica correspondiente a tales concentraciones de cloruro de sodio.

Generalmente, las composiciones para almacenar partículas de ARN lipoplejo tales como para congelar partículas de ARN lipoplejo tales como las descritas en este documento comprenden bajas concentraciones de cloruro de sodio, o comprende una fuerza iónica baja. En una modalidad, el cloruro de sodio está en una concentración de 0 mM a aproximadamente 50 mM,

- de 0 mM a aproximadamente 40 mM, o de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM. En modalidades específicas, el cloruro de sodio está a una concentración de aproximadamente 1 mM, aproximadamente 2 mM, aproximadamente 3 mM, aproximadamente 4 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 6 mM, aproximadamente 7 mM,
- 5 aproximadamente 8 mM, aproximadamente 9 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 11 mM, aproximadamente 12 mM, aproximadamente 13 mM, aproximadamente 14 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 16 mM, aproximadamente 17 mM, aproximadamente 18 mM, aproximadamente 19 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 21 mM, aproximadamente 22 mM,
- 10 aproximadamente 23 mM, aproximadamente 24 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 26 mM, aproximadamente 27 mM, aproximadamente 28 mM, aproximadamente 29 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 31 mM, aproximadamente 32 mM, aproximadamente 33 mM, aproximadamente 34 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 36 mM, aproximadamente 37 mM,
- 15 aproximadamente 38 mM, aproximadamente 39 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 41 mM, aproximadamente 42 mM, aproximadamente 43 mM, aproximadamente 44 mM, aproximadamente 45 mM, aproximadamente 46 mM, aproximadamente 47 mM, aproximadamente 48 mM, aproximadamente 49 mM o aproximadamente 50 mM. En modalidades preferidas, el cloruro de sodio está a una
- 20 concentración de aproximadamente 20 mM, aproximadamente 30 mM o aproximadamente 40 mM. En una modalidad ejemplar, el cloruro de sodio está a una concentración de 20 mM. En otra modalidad ejemplar, el cloruro de sodio está a una concentración de 30 mM. En una modalidad, las composiciones comprenden una fuerza iónica correspondiente a tales concentraciones de cloruro de sodio.
- 25 Generalmente, las composiciones resultantes de descongelar composiciones de partículas de lipoplejo de ARN congeladas y opcionalmente ajustar la osmolalidad y la fuerza iónica mediante la adición de un líquido acuoso comprenden altas concentraciones de cloruro de sodio, o comprende una alta fuerza iónica. En una modalidad, el cloruro de sodio está a una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM, o de
- 30 aproximadamente 80 mM a aproximadamente 150 mM. En una modalidad, las composiciones comprenden una fuerza iónica correspondiente a tales concentraciones de cloruro de sodio.

B. Estabilizador

Las composiciones descritas en el presente documento pueden comprender un estabilizador para evitar una pérdida sustancial de la calidad del producto y, en particular, una pérdida sustancial de la actividad del ARN durante la congelación, liofilización o secado por atomización y almacenamiento de la composición congelada, liofilizada o secada por atomización. Una composición de este tipo también se denomina estable en el presente documento. Normalmente, el estabilizador está presente antes del proceso de congelación, liofilización o secado por atomización y persiste en la preparación congelada, liofilizada o secada por congelación resultante. Se puede utilizar para proteger las partículas lipoplejo de ARN durante la congelación, liofilización o secado por atomización y almacenamiento de la preparación congelada, liofilizada o secada por congelación, por ejemplo, para reducir o prevenir la agregación, el colapso de partículas, la degradación del ARN y/u otros tipos de daños.

En una modalidad, el estabilizador es un carbohidrato. El término "carbohidrato", como se usa en el presente documento, se refiere y abarca monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, oligosacáridos y polisacáridos.

En una modalidad, el estabilizador es un monosacárido. El término "monosacárido", como se usa en el presente documento, se refiere a una única unidad de carbohidrato (por ejemplo, un azúcar simple) que no se puede hidrolizar a unidades de carbohidrato más simples. Los estabilizadores de monosacáridos ejemplares incluyen glucosa, fructosa, galactosa, xilosa, ribosa y similares.

En una modalidad, el estabilizador es un disacárido. El término "disacárido", como se usa en este documento, se refiere a un compuesto o un resto químico formado por 2 unidades de monosacárido que están unidas entre sí a través de un enlace glicosídico, por ejemplo, a través de enlaces 1-4 o enlaces 1-6. Un disacárido puede hidrolizarse en dos monosacáridos. Los estabilizadores de disacáridos ejemplares incluyen sacarosa, trehalosa, lactosa, maltosa y similares.

El término "trisacárido" significa tres azúcares unidos entre sí para formar una molécula. Los ejemplos de trisacáridos incluyen rafinosa y melezitosa.

En una modalidad, el estabilizador es un oligosacárido. El término "oligosacárido", como se usa en este documento, se refiere a un compuesto o un resto químico formado por 3 a aproximadamente 15, preferiblemente de 3 a aproximadamente 10 unidades de monosacárido que se unen entre sí a través de enlaces glicosídicos, por ejemplo, a través de enlaces 1-4 o 1-6 enlaces, para formar una estructura lineal, ramificada o cíclica. Los estabilizadores de

oligosacáridos ejemplares incluyen ciclodextrinas, rafinosa, melezitosa, maltotriosa, estaquiosa, acarbosa y similares. Un oligosacárido se puede oxidar o reducir.

En una modalidad, el estabilizador es un oligosacárido cíclico. El término "oligosacárido cíclico", como se usa en este documento, se refiere a un compuesto o un resto químico formado por 3 a aproximadamente 15, preferiblemente 6, 7, 8, 9 o 10 unidades de monosacárido que se unen entre sí a través de enlaces glicosídicos, por ejemplo, a través de 1-4 enlaces o 1-6 enlaces, para formar una estructura cíclica. Los estabilizadores de oligosacáridos cíclicos ejemplares incluyen oligosacáridos cíclicos que son compuestos discretos, tales como α ciclodextrina, β ciclodextrina o γ ciclodextrina.

- 10 Otros estabilizadores de oligosacáridos cíclicos ejemplares incluyen compuestos que incluyen un resto de ciclodextrina en una estructura molecular más grande, tal como un polímero que contiene un resto de oligosacárido cíclico. Un oligosacárido cíclico se puede oxidar o reducir, por ejemplo, oxidar a formas de dicarbonilo. El término "resto ciclodextrina", como se usa en el presente documento, se refiere a un radical ciclodextrina (por ejemplo, un α , β o γ ciclodextrina) que se incorpora en, o es parte de, una estructura molecular más grande, tal como un polímero. Un resto de ciclodextrina se puede unir a uno o más de otros restos directamente, o mediante un enlazador opcional. Un resto de ciclodextrina se puede oxidar o reducir, por ejemplo, oxidar a formas de dicarbonilo.

- Los estabilizadores de carbohidratos, por ejemplo, estabilizadores de oligosacáridos cíclicos, pueden ser carbohidratos derivatizados. Por ejemplo, en una modalidad, el estabilizador es un oligosacárido cíclico derivatizado, por ejemplo, una ciclodextrina derivatizada, por ejemplo, 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina, por ejemplo, ciclodextrinas parcialmente eterificadas (por ejemplo, β ciclodextrinas parcialmente eterificadas).

- Un estabilizador ejemplar es un polisacárido. El término "polisacárido", como se usa en este documento, se refiere a un compuesto o un resto químico formado por al menos 16 unidades de monosacárido que están unidas entre sí a través de enlaces glicosídicos, por ejemplo, a través de enlaces 1-4 o enlaces 1-6, para formar un enlace lineal, estructura ramificada o cíclica, e incluye polímeros que comprenden polisacáridos como parte de su estructura principal. En las cadenas principales, el polisacárido puede ser lineal o cíclico. Los estabilizadores de polisacáridos ejemplares incluyen glucógeno, amilasa, celulosa, dextrano, maltodextrina y similares.

En una modalidad, el estabilizador es un alcohol de azúcar. Como se usa en este documento, el término "alcohol de azúcar" se refiere a productos de reducción de "azúcares" e indica que todos

los átomos de oxígeno en una molécula de alcohol de azúcar simple están presentes en forma de grupos hidroxilo. Los alcoholes de azúcar son "polioles". Este término se refiere a compuestos químicos que contienen tres o más grupos hidroxilo y es sinónimo de otro término habitual, alcohol polihídrico. Los ejemplos de alcoholes de azúcar incluyen, pero no se limitan a, sorbitol, manitol, maltitol, lactitol, eritritol, glicerina, xilitol o inositol.

Según la presente divulgación, se proporcionan composiciones farmacéuticas que incluyen sacarosa como estabilizador. Sin desear estar obligado por la teoría, la sacarosa funciona para promover la crioprotección de la composición, evitando así la agregación de partículas de ARN lipoplejo y manteniendo la estabilidad química y física de la composición. Ciertas modalidades contemplan estabilizadores alternativos a la sacarosa en la presente divulgación. Los estabilizadores alternativos incluyen, sin limitación, trehalosa, glucosa, fructosa, arginina, glicerina, manitol, prolina, sorbitol, glicina betaína y dextrano. En una modalidad específica, un estabilizador alternativo a la sacarosa es la trehalosa.

En una modalidad, el estabilizador está en una concentración de aproximadamente 5% (p/v) a aproximadamente 35% (p/v), o de aproximadamente 10% (p/v) a aproximadamente 25% (p/v).

En modalidades específicas, el estabilizador está en una concentración de aproximadamente el 10% (p/v), aproximadamente el 11% (p/v), aproximadamente el 12% (p/v), aproximadamente el 13% (p/v), aproximadamente el 14% (p/v), aproximadamente el 15% (p/v), aproximadamente el 16% (p/v), aproximadamente el 17% (p/v), aproximadamente el 18% (p/v), aproximadamente el 19% (p/v), aproximadamente el 20% (p/v), aproximadamente el 21% (p/v), aproximadamente el 22% (p/v), aproximadamente el 23% (p/v), aproximadamente el 24% (p/v) o aproximadamente el 25% (P/v). En una modalidad preferida, el estabilizador está a una concentración de aproximadamente el 15% (p/v) a aproximadamente el 25% (p/v).

En otra modalidad preferida, el estabilizador está a una concentración de aproximadamente el 20% (p/v) a aproximadamente el 25% (p/v). En una modalidad ejemplar, el estabilizador está a una concentración de aproximadamente el 25% (p/v). En otra modalidad ejemplar, el estabilizador está a una concentración de aproximadamente 22% (p/v). En modalidades de la divulgación, el estabilizador es sacarosa o trehalosa. En una modalidad de la divulgación, el estabilizador es sacarosa. En una modalidad de la divulgación, el estabilizador es trehalosa.

Según la presente divulgación, las composiciones de partículas de ARN lipoplejo descritas en este documento tienen una concentración de estabilizador adecuada para la estabilidad de la composición, en particular para la estabilidad de las partículas de ARN lipoplejo y para la estabilidad del ARN.

C. pH y Tampón

Según la presente divulgación, las composiciones de partículas de ARN lipoplejo descritas en este documento tienen un pH adecuado para la estabilidad de las partículas de ARN lipoplejo y, en particular, para la estabilidad del ARN. En una modalidad, las composiciones de partículas de ARN lipoplejo descritas en este documento tienen un pH de aproximadamente 5.7 a aproximadamente 6.7. En modalidades específicas, las composiciones tienen un pH de aproximadamente 5.7, aproximadamente 5.8, aproximadamente 5.9, aproximadamente 6.0, aproximadamente 6.1, aproximadamente 6.2, aproximadamente 6.3, aproximadamente 6.4, aproximadamente 6.5, aproximadamente 6.6 o aproximadamente 6.7.

Según la presente divulgación, se proporcionan composiciones que incluyen tampón. Sin desear estar obligado por la teoría, el uso de tampón mantiene el pH de la composición durante la fabricación, el almacenamiento y el uso de la composición. En determinadas modalidades de la presente divulgación, el tampón puede ser bicarbonato de sodio, fosfato monosódico, fosfato disódico, fosfato monopotásico, fosfato dipotásico, ácido [tris(hidroximetil)metilamino] propanosulfónico (TAPS), ácido 2-(bis(2-hidroxietil)amino) acético (Bicina), 2-Amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (Tris), N-(2-Hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil)glicina (Tricina), 3-[[1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il]amino]-2-hidroxipropano-1-sulfónico (TAPSO), ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-ilo] etanosulfónico (HEPES), ácido 2-[[1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il]amino] etanosulfónico (TES), ácido 1,4-piperazindietanosulfónico (PIPES), ácido dimetilarsínico, 2-ácido morfolino-4-iletanosulfónico (MES), ácido 3-morfolino-2-hidroxipropanosulfónico (MOPSO) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). Otros tampones adecuados pueden ser ácido acético en una sal, ácido cítrico en una sal, ácido bórico en una sal y ácido fosfórico en una sal.

En algunas modalidades, el tampón tiene un pH de aproximadamente 5.7 a aproximadamente 6.7. En modalidades específicas, el tampón tiene un pH de aproximadamente 5.7, aproximadamente 5.8, aproximadamente 5.9, aproximadamente 6.0, aproximadamente 6.1, aproximadamente 6.2, aproximadamente 6.3, aproximadamente 6.4, aproximadamente 6.5, aproximadamente 6.6 o aproximadamente 6.7. En una modalidad, el tampón es HEPES. En una modalidad preferida, el HEPES tiene un pH de aproximadamente 5.7 a aproximadamente 6.7. En modalidades específicas, el HEPES tiene un pH de aproximadamente 5.7, aproximadamente 5.8, aproximadamente 5.9, aproximadamente 6.0, aproximadamente 6.1, aproximadamente 6.2, aproximadamente 6.3, aproximadamente 6.4, aproximadamente 6.5, aproximadamente 6.6 o

aproximadamente 6.7. En una modalidad ejemplar, el HEPES tiene un pH de aproximadamente 6.2.

En otra modalidad más, el tampón tiene una concentración de aproximadamente 2.5 mM a aproximadamente 10 mM. En modalidades específicas donde HEPES es el tampón, la

5 concentración de HEPES es aproximadamente 2.5 mM, aproximadamente 2.75 mM, 3.0 mM, aproximadamente 3.25 mM, aproximadamente 3.5 mM, aproximadamente 3.75 mM, aproximadamente 4.0 mM, aproximadamente 4.25 mM, aproximadamente 4.5 mM, aproximadamente 4.75 mM, aproximadamente 5.0 mM, aproximadamente 5.25 mM, aproximadamente 5.5 mM, aproximadamente 5.75 mM, aproximadamente 6.0 mM,

10 aproximadamente 6.25 mM, aproximadamente 6.5 mM, aproximadamente 6.75 mM, aproximadamente 7.0 mM, aproximadamente 7.25 mM, aproximadamente 7.5 mM, aproximadamente 7.75 mM , aproximadamente 8.0 mM, aproximadamente 8.25 mM, aproximadamente 8.5 mM, aproximadamente 8.75 mM, aproximadamente 9.0 mM, aproximadamente 9.25 mM, aproximadamente 9.5 mM, aproximadamente 9.75 mM o

15 aproximadamente 10.0 mM. En una modalidad preferida, el HEPES está a una concentración de aproximadamente 7.5 mM.

D. Agente quelante

Ciertas modalidades de la presente divulgación contemplan el uso de un agente quelante. Los

20 agentes quelantes se refieren a compuestos químicos que son capaces de formar al menos dos enlaces covalentes coordinados con un ión metálico, generando así un complejo estable soluble en agua. Sin desear estar obligado por la teoría, los agentes quelantes reducen la concentración de iones divalentes libres, que de otro modo pueden inducir una degradación acelerada del ARN en la presente divulgación. Ejemplos de agentes quelantes adecuados incluyen, sin limitación,

25 ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), una sal de EDTA, desferrioxamina B, deferoxamina, ditiocarb sódico, penicilamina, pentetato cálcico, una sal sódica de ácido pentético, succímero, trientina, ácido nitrilotriacético, trans- ácido diaminociclohexanotetraacético (DCTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido bis (aminoetil) glicoléter-N, N, N', N'-tetraacético, ácido iminodiacético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido fumárico o una sal de los mismos. En

30 determinadas modalidades, el agente quelante es EDTA o una sal de EDTA. En una modalidad ejemplar, el agente quelante es EDTA dihidrato disódico.

En algunas modalidades, el EDTA se encuentra en una concentración de aproximadamente 0.25 mM a aproximadamente 5 mM. En modalidades específicas, el EDTA está a una concentración

de aproximadamente 0.25 mM, aproximadamente 0.3 mM, aproximadamente 0.4 mM, aproximadamente 0.5 mM, aproximadamente 0.6 mM, aproximadamente 0.7 mM, aproximadamente 0.8 mM, aproximadamente 0.9 mM, aproximadamente 1.0 mM, aproximadamente 1.1 mM , aproximadamente 1.2 mM, aproximadamente 1.3 mM, 5 aproximadamente 1.4 mM, aproximadamente 1.5 mM, aproximadamente 1.6 mM, aproximadamente 1.7 mM, aproximadamente 1.8 mM, aproximadamente 1.9 mM, aproximadamente 2.0 mM, aproximadamente 2.1 mM, aproximadamente 2.2 mM, aproximadamente 2.3 mM. aproximadamente 2.4 mM, aproximadamente 2.5 mM, aproximadamente 2.6 mM, aproximadamente 2.7 mM, aproximadamente 2.8 mM, 10 aproximadamente 2.9 mM, aproximadamente 3.0 mM, aproximadamente 3.1 mM, aproximadamente 3.2 mM, aproximadamente 3.3 mM, aproximadamente 3.4 mM, aproximadamente 3.5 mM, aproximadamente 3.6 mM, aproximadamente 3.7 mM, aproximadamente 3.8 mM, aproximadamente 3.9 mM, aproximadamente 4.0 mM, aproximadamente 4.1 mM, aproximadamente 4.2 mM, aproximadamente 4.3 mM, 15 aproximadamente 4.4 mM, aproximadamente 4.5 mM, aproximadamente 4.6 mM, aproximadamente 4.7 mM, aproximadamente 4.8 mM, aproximadamente 4.9 mM, o aproximadamente 5.0 mM. En una modalidad preferida, el EDTA está en una concentración de aproximadamente 2.5 mM.

20 **E. Composiciones ejemplares de la divulgación**

En una modalidad ejemplar, la composición de las partículas de ARN lipoplejo incluye DOTMA y DOPE en una relación molar de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:1 y ARN en una concentración de aproximadamente 0.05 mg/ml que codifica al menos un epítipo, donde en condiciones fisiológicas pH la relación de carga de cargas positivas a cargas negativas 25 en las partículas lipoplejo de ARN es de aproximadamente 1.3:2.0; cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 20 mM; sacarosa a una concentración de aproximadamente 22% (p/v); HEPES a una concentración de aproximadamente 7.5 mM con un pH de aproximadamente 6.2; y EDTA a una concentración de aproximadamente 2.5 mM. En modalidades específicas adicionales, el ARN codifica cinco epítopos o diez epítopos.

30 En otra modalidad ejemplar, la composición de partículas lipoplejo de ARN incluye DOTMA y DOPE en una relación molar de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:1 y ARN en una concentración de aproximadamente 0.05 mg/ml que codifica al menos un epítipo, donde en condiciones fisiológicas pH la relación de carga de cargas positivas a cargas negativas en las

partículas lipoplejo de ARN es de aproximadamente 1.3: 2.0; cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 30 mM; sacarosa a una concentración de aproximadamente el 20% (p/v); HEPES a una concentración de aproximadamente 7.5 mM con un pH de aproximadamente 6.2; y EDTA a una concentración de aproximadamente 2.5 mM. En 5 modalidades específicas adicionales, el ARN codifica cinco epítomos o diez epítomos.

F. Estabilidad de las composiciones de la divulgación

Como se usa en este documento, "estable" se refiere a una composición en donde los valores medidos para varios parámetros fisicoquímicos están dentro de un rango definido. En una 10 modalidad, la composición se analiza para evaluar la estabilidad de acuerdo con varios parámetros. Según la presente divulgación, los parámetros de estabilidad incluyen, sin limitación, el diámetro medio de las partículas lipoplejo de ARN, el índice de polidispersidad, la integridad del ARN, el contenido de ARN, el pH, la osmolalidad y el número de partículas sub-visibles. Un experto en la técnica podrá medir dichos parámetros utilizando técnicas e 15 instrumentación de laboratorio de rutina. Por ejemplo, los parámetros de estabilidad pueden evaluarse usando dispersión de luz dinámica (DLS), oscurecimiento de la luz, espectrometría, electroforesis en gel de agarosa, bioanalizador u otra técnica adecuada. En una modalidad, el bioanalizador es un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies) capaz de medir tanto la integridad del ARN como el contenido de ARN. En una modalidad, el bioanalizador es un 20 analizador de fragmentos de Advanced Analytical.

Sin desear estar obligado por la teoría, las mediciones de DLS son útiles para analizar parámetros relacionados con partículas lipoplejo de ARN de la presente divulgación. En una modalidad, se puede usar DLS para determinar el diámetro medio de las partículas lipoplejo de ARN, que se expresa en términos de Z-avg (una medida para el tamaño medio de partícula). En 25 otra modalidad, se puede usar DLS para determinar el índice de polidispersidad de las partículas de ARN lipoplejo, que indica el tamaño y la distribución de peso de las partículas de ARN lipoplejo.

En ciertas modalidades, la composición es estable cuando las mediciones de los parámetros de estabilidad están dentro de un rango definido. En una modalidad de una composición estable, 30 las partículas de ARN lipoplejo tienen un diámetro promedio que difiere del diámetro promedio original (es decir, el diámetro promedio antes de la congelación, secado por congelación o secado por atomización y descongelación o reconstitución) en no más de $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ o $\pm 3\%$ después del almacenamiento, por ejemplo, después del almacenamiento a una

temperatura de aproximadamente -15 °C a aproximadamente -40 °C. En una modalidad de una composición estable, las partículas de ARN lipoplejo tienen un diámetro promedio que no es mayor del 20%, 10%, 5% o 3% en comparación con el diámetro promedio original (es decir, el diámetro promedio antes de la congelación, secado por congelación, o secado por atomización y descongelación o reconstitución) después del almacenamiento, por ejemplo, después del almacenamiento a una temperatura de aproximadamente -15 °C a aproximadamente -40 °C. En otra modalidad de una composición estable, las partículas lipoplejo de ARN tienen un índice de polidispersidad que difiere del índice de polidispersidad original (es decir, el índice de polidispersidad antes de la congelación, secado por congelación o secado por atomización y descongelación o reconstitución) en no más de $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ o $\pm 3\%$ después del almacenamiento, por ejemplo, después del almacenamiento a una temperatura de aproximadamente -15 °C a aproximadamente -40 °C. En una modalidad, una composición estable no tiene más de 6.000 partículas subvisibles con un diámetro mayor o igual a 10 μm después del almacenamiento, por ejemplo, después del almacenamiento a una temperatura de aproximadamente -15°C a aproximadamente -40°C. En una modalidad, una composición estable no tiene más de 600 partículas subvisibles con un diámetro mayor o igual a 25 μm después del almacenamiento, por ejemplo, después del almacenamiento a una temperatura de aproximadamente -15°C a aproximadamente -40°C.

En una modalidad de una composición estable, la integridad del ARN es al menos del 80 por ciento después del almacenamiento, por ejemplo, después del almacenamiento a una temperatura de aproximadamente -15°C a aproximadamente -40°C.

En una modalidad, la composición es estable a una temperatura de almacenamiento de aproximadamente -15 °C a aproximadamente -40 °C. En modalidades específicas, la composición es estable a una temperatura de aproximadamente -15 °C, aproximadamente -16 °C, aproximadamente -17 °C, aproximadamente -18 °C, aproximadamente -19 °C, aproximadamente -20 °C, aproximadamente -21 °C, aproximadamente -22 °C, aproximadamente -23 °C, aproximadamente -24 °C, aproximadamente -25 °C, aproximadamente -26 °C, aproximadamente -27 °C, aproximadamente -28 °C, aproximadamente -29 °C, aproximadamente -30 °C, aproximadamente -31 °C, aproximadamente -32 °C, aproximadamente -33 °C, aproximadamente -34 °C, aproximadamente -35 °C, aproximadamente -36 °C, aproximadamente -37 °C, aproximadamente -38 °C, aproximadamente -39 °C o aproximadamente -40 °C. En una

modalidad preferida, la composición es estable a una temperatura de aproximadamente -15 °C, aproximadamente -20 °C, aproximadamente -30 °C o aproximadamente -40 °C.

En una modalidad, la composición es estable a una temperatura de aproximadamente -15 °C a aproximadamente -40 °C cuando la composición farmacéutica está protegida de la luz. En una

5 modalidad preferida, la composición es estable a una temperatura de aproximadamente -15 °C a aproximadamente -25 °C cuando la composición está protegida de la luz.

En una modalidad, la composición es estable a una temperatura de aproximadamente -15 °C a aproximadamente -40 °C durante al menos 1 mes hasta aproximadamente 24 meses. En modalidades específicas, la composición es estable a una temperatura de aproximadamente -15

10 °C a aproximadamente -40 °C durante al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses, al menos 13 meses, al menos 14 meses, al menos 15 meses, al menos al menos 16 meses, al menos 17 meses, al menos 18 meses, al menos 19 meses, al menos 20 meses, al menos 21 meses, al menos 22 meses, al menos 23 meses, al menos 24 meses, al menos 25 meses, al menos al menos 26 meses, al menos 27 meses, al menos 28 meses, al menos 29 meses, al menos 30 meses, al menos 31 meses, al menos 32 meses, al menos 33 meses, al menos 34 meses, al menos 35 meses, o al menos 36 meses.

En una modalidad preferida, la composición es estable a una temperatura de aproximadamente 20 -15 °C durante al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses o al menos 6 meses.

En otra modalidad preferida, la composición es estable a una temperatura de aproximadamente -20 °C durante al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses o al menos 6 meses.

25 En otra modalidad preferida más, la composición es estable a una temperatura de aproximadamente -30 °C durante al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses o al menos 6 meses.

En una modalidad, la composición es estable después de congelar a una temperatura de aproximadamente -15 °C a aproximadamente -40 °C y descongelar a una temperatura de 30 aproximadamente 4 °C a aproximadamente 25 °C (temperatura ambiente). En otra modalidad, la composición es estable después de congelar a una temperatura de aproximadamente -15 °C a aproximadamente -40 °C y descongelar a una temperatura de aproximadamente 4 °C a

aproximadamente 25 °C (temperatura ambiente) en múltiples ciclos de congelación-descongelación.

G. Estado físico de las composiciones de la divulgación

- 5 En modalidades, la composición de la presente divulgación es un líquido o un sólido. Los ejemplos no limitantes de un sólido incluyen una forma congelada o una forma liofilizada. En una modalidad preferida, la composición es un líquido.

Composiciones farmacéuticas de la divulgación

- 10 Las composiciones que comprenden partículas lipoplejo de ARN descritas en el presente documento son útiles como o para preparar composiciones farmacéuticas o medicamentos para tratamientos terapéuticos o profilácticos.

Las partículas de la presente divulgación se pueden administrar en forma de cualquier composición farmacéutica adecuada.

- 15 El término "composición farmacéutica" se refiere a una formulación que comprende un agente terapéuticamente eficaz, preferiblemente junto con vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Dicha composición farmacéutica es útil para tratar, prevenir o reducir la gravedad de una enfermedad o trastorno mediante la administración de dicha composición farmacéutica a un sujeto. Una composición farmacéutica también se conoce en la
- 20 técnica como formulación farmacéutica. En el contexto de la presente divulgación, la composición farmacéutica comprende partículas lipoplejo de ARN como se describe en el presente documento.

- Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación comprenden preferiblemente uno o más adyuvantes o pueden administrarse con uno o más adyuvantes. El término "adyuvante"
- 25 se refiere a un compuesto que prolonga, potencia o acelera una respuesta inmune. Los adyuvantes comprenden un grupo heterogéneo de compuestos tales como emulsiones oleosas (por ejemplo, adyuvantes de Freund), compuestos minerales (tales como alumbre), productos bacterianos (tales como toxina de Bordetella pertussis) o complejos inmunoestimulantes. Los ejemplos de adyuvantes incluyen, sin limitación, LPS, GP96, oligodesoxinucleótidos CpG,
- 30 factores de crecimiento y citocinas, tales como monoquinas, linfocinas, interleucinas, quimiocinas. Las quimiocinas pueden ser IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, INF α , INF- γ , GM-CSF, LT- α . Otros adyuvantes conocidos son hidróxido de

aluminio, adyuvante de Freund o aceite tal como Montanide® ISA51. Otros adyuvantes adecuados para usar en la presente divulgación incluyen lipopéptidos, tales como Pam3Cys.

Las composiciones farmacéuticas según la presente divulgación se aplican generalmente en una "cantidad farmacéuticamente eficaz" y en "una preparación farmacéuticamente aceptable".

- 5 El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a la no toxicidad de un material que no interactúa con la acción del componente activo de la composición farmacéutica.

El término "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad que logra una reacción deseada o un efecto deseado solo o junto con dosis adicionales. En el caso del tratamiento de una enfermedad particular, la reacción deseada se refiere preferiblemente a la inhibición del

- 10 curso de la enfermedad. Esto comprende ralentizar el progreso de la enfermedad y, en particular, interrumpir o revertir el progreso de la enfermedad. La reacción deseada en un tratamiento de una enfermedad también puede ser un retraso del inicio o una prevención del inicio de dicha enfermedad o dicha condición. Una cantidad eficaz de las partículas o composiciones descritas en este documento dependerá de la afección a tratar, la gravedad de la
- 15 enfermedad, los parámetros individuales del paciente, incluida la edad, la afección fisiológica, el tamaño y el peso, la duración del tratamiento, el tipo de una terapia de acompañamiento (si está presente), la vía específica de administración y factores similares. Por consiguiente, las dosis administradas de las partículas o composiciones descritas en este documento pueden depender de varios de dichos parámetros. En el caso de que una reacción en un paciente sea
- 20 insuficiente con una dosis inicial, se pueden usar dosis más altas (o dosis efectivamente más altas logradas por una vía de administración diferente, más localizada).

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden contener sales, tampones, conservantes y opcionalmente otros agentes terapéuticos. En una modalidad, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación comprenden uno o más vehículos, diluyentes y/o

- 25 excipientes farmacéuticamente aceptables.

Los conservantes adecuados para usar en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen, sin limitación, cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabeno y timerosal.

- El término "excipiente" como se usa en este documento se refiere a una sustancia que puede
- 30 estar presente en una composición farmacéutica de la presente divulgación pero que no es un ingrediente activo. Los ejemplos de excipientes incluyen, sin limitación, vehículos, aglutinantes, diluyentes, lubricantes, espesantes, agentes tensioactivos, conservantes, estabilizadores, emulsionantes, tampones, agentes aromatizantes o colorantes.

El término "diluyente" se refiere a un agente diluyente y/o diluyente. Además, el término "diluyente" incluye uno cualquiera o más de suspensiones y/o medios de mezcla fluidos, líquidos o sólidos. Los ejemplos de diluyentes adecuados incluyen etanol, glicerol y agua.

El término "vehículo" se refiere a un componente que puede ser natural, sintético, orgánico,

5 inorgánico en donde el componente activo se combina para facilitar, mejorar o permitir la administración de la composición farmacéutica. Un vehículo como se usa en este documento puede ser una o más cargas, diluyentes o sustancias encapsulantes sólidos o líquidos compatibles, que son adecuados para la administración al sujeto. Los vehículos adecuados incluyen, sin limitación, agua estéril, Ringer, lactato de Ringer, solución estéril de cloruro de
10 sodio, solución salina isotónica, polialquilenglicoles, naftalenos hidrogenados y, en particular, polímeros de lactida biocompatibles, copolímeros de lactida/glicólido o copolímeros de polioxietileno/polioxipropileno. En una modalidad, la composición farmacéutica de la presente divulgación incluye solución salina isotónica.

Los vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables para uso terapéutico son
15 bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R Gennaro edit. 1985).

Los vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticos pueden seleccionarse con respecto a la vía de administración pretendida y la práctica farmacéutica estándar.

20 Vías de administración de las composiciones farmacéuticas de la divulgación

En una modalidad, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden administrar por vía intravenosa, intraarterial, subcutánea, intradérmica o intramuscular.

En determinadas modalidades, la composición farmacéutica se formula para la administración local o sistémica. La administración sistémica puede incluir la administración enteral, que

25 implica la absorción a través del tracto gastrointestinal, o la administración parenteral. Como se usa en este documento, "administración parenteral" se refiere a la administración de cualquier otra manera que no sea a través del tracto gastrointestinal, como por inyección intravenosa. En una modalidad preferida, las composiciones farmacéuticas se formulan para administración sistémica. En otra modalidad preferida, la administración sistémica es por administración
30 intravenosa.

Artículos de manufactura

En un aspecto, las partículas de ARN lipoplejo descritas en el presente documento están presentes en una composición farmacéutica. En otro aspecto, una composición descrita en el presente documento es una composición farmacéutica.

- 5 En un aspecto, la divulgación se refiere a un vial que contiene una composición farmacéutica descrita en el presente documento. En otro aspecto, la divulgación se refiere a una jeringa que contiene una composición farmacéutica descrita en el presente documento.

Uso de composiciones farmacéuticas de la divulgación

- 10 Las partículas de ARN lipoplejo descritas en el presente documento pueden usarse en el tratamiento terapéutico o profiláctico de diversas enfermedades, en particular enfermedades en las que la provisión de un péptido o proteína a un sujeto da como resultado un efecto terapéutico o profiláctico. Por ejemplo, la provisión de un antígeno o epítopo que se deriva de un virus puede ser útil en el tratamiento de una enfermedad viral causada por dicho virus. La provisión
- 15 de un antígeno o epítopo tumoral puede ser útil en el tratamiento de una enfermedad cancerosa en donde las células cancerosas expresan dicho antígeno tumoral.

El término "enfermedad" se refiere a una condición anormal que afecta el cuerpo de un individuo. Una enfermedad se suele interpretar como una afección médica asociada con signos y síntomas específicos. Una enfermedad puede ser causada por factores originalmente de una

- 20 fuente externa, como una enfermedad infecciosa, o puede ser causada por disfunciones internas, como enfermedades autoinmunes. En los seres humanos, "enfermedad" se usa a menudo de manera más amplia para referirse a cualquier condición que cause dolor, disfunción, angustia, problemas sociales o la muerte del individuo afectado, o problemas similares para quienes están en contacto con el individuo. En este sentido más amplio, a veces incluye lesiones,
- 25 discapacidades, trastornos, síndromes, infecciones, síntomas aislados, conductas desviadas y variaciones atípicas de estructura y función, mientras que en otros contextos y para otros fines pueden considerarse categorías distinguibles. Las enfermedades generalmente afectan a las personas no solo físicamente, sino también emocionalmente, ya que contraer y vivir con muchas enfermedades puede alterar la perspectiva de la vida y la personalidad de uno.

- 30 En el presente contexto, el término "tratamiento", "tratar" o "intervención terapéutica" se refiere al manejo y cuidado de un sujeto con el propósito de combatir una condición tal como una enfermedad o trastorno. El término está destinado a incluir el espectro completo de tratamientos para una afección determinada que padece el sujeto, como la administración del compuesto

terapéuticamente eficaz para aliviar los síntomas o complicaciones, para retrasar la progresión de la enfermedad, trastorno o afección, para aliviar o aliviar los síntomas y complicaciones, y/o curar o eliminar la enfermedad, trastorno o afección, así como para prevenir la afección, en donde la prevención debe entenderse como el manejo y cuidado de un individuo con el propósito de combatir la enfermedad. , condición o trastorno e incluye la administración de los compuestos activos para prevenir la aparición de los síntomas o complicaciones.

El término "tratamiento terapéutico" se refiere a cualquier tratamiento que mejora el estado de salud y/o prolonga (aumenta) la vida útil de un individuo. Dicho tratamiento puede eliminar la enfermedad en un individuo, detener o retardar el desarrollo de una enfermedad en un individuo, inhibir o retardar el desarrollo de una enfermedad en un individuo, disminuir la frecuencia o severidad de los síntomas en un individuo y/o disminuir la recurrencia en un individuo que actualmente tiene o que previamente ha tenido una enfermedad.

Los términos "tratamiento profiláctico" o "tratamiento preventivo" se refieren a cualquier tratamiento destinado a prevenir la aparición de una enfermedad en un individuo. Los términos

"tratamiento profiláctico" o "tratamiento preventivo" se utilizan aquí de forma intercambiable. Los términos "individuo" y "sujeto" se usan aquí de manera intercambiable. Se refieren a un ser humano u otro mamífero (por ejemplo, ratón, rata, conejo, perro, gato, ganado, cerdo, oveja, caballo o primate) que puede estar afectado o es susceptible a una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) pero que puede o puede que no tenga la enfermedad o el trastorno. En muchas formas de modalidad, el individuo es un ser humano. A menos que se indique lo contrario, los términos "individuo" y "sujeto" no denotan una edad en particular y, por lo tanto, abarcan a adultos, ancianos, niños y recién nacidos. En modalidades de la presente divulgación, el "individuo" o "sujeto" es un "paciente".

El término "paciente" significa un individuo o sujeto para tratamiento, en particular un individuo o sujeto enfermo.

En una modalidad de la divulgación, el objetivo es proporcionar una respuesta inmune contra las células enfermas que expresan un antígeno, como las células cancerosas que expresan un antígeno tumoral, y para tratar una enfermedad como una enfermedad cancerosa que implica células que expresan un antígeno como un antígeno tumoral.

Una composición farmacéutica que comprende partículas lipoplejo de ARN como se describe en el presente documento que comprende ARN que codifica un Se puede administrar un péptido o proteína que comprende uno o más antígenos o uno o más epítopos a un sujeto para provocar una respuesta inmune contra uno o más antígenos o uno o más epítopos en el sujeto que pueden

ser terapéuticos o protectores parcial o totalmente. Un experto en la materia sabrá que uno de los principios de la inmunoterapia y la vacunación se basa en el hecho de que se produce una reacción inmunoprotectora frente a una enfermedad inmunizando a un sujeto con un antígeno o un epítipo, inmunológicamente relevante con respecto a la enfermedad. enfermedad a tratar.

- 5 Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas descritas en este documento son aplicables para inducir o potenciar una respuesta inmune. Por tanto, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento son útiles en un tratamiento profiláctico y/o terapéutico de una enfermedad que implica un antígeno o epítipo.

- 10 Como se usa en este documento, "respuesta inmune" se refiere a una respuesta corporal integrada a un antígeno o una célula que expresa un antígeno y se refiere a una respuesta inmune celular y/o una respuesta inmune humoral. Una respuesta inmune celular incluye, sin limitación, una respuesta celular dirigida a células que expresan un antígeno y que se caracteriza por la presentación de un antígeno con una molécula de MHC de clase I o clase II. La respuesta celular se relaciona con los linfocitos T, que pueden clasificarse como células T auxiliares (también
- 15 denominadas células T CD4) que desempeñan un papel central al regular la respuesta inmune o células asesinas (también denominadas células T citotóxicas, células T CD8 o CTL). que inducen la apoptosis en células infectadas o células cancerosas. En una modalidad, la administración de una composición farmacéutica de la presente divulgación implica la estimulación de una respuesta de células T CD8 antitumorales contra células cancerosas que
- 20 expresan uno o más antígenos tumorales. En una modalidad específica, los antígenos tumorales se presentan con una molécula de MHC de clase I.

- La presente divulgación contempla una respuesta inmune que puede ser protectora, preventiva, profiláctica y/o terapéutica. Como se usa en este documento, "induce [o que induce] una respuesta inmune" puede indicar que no hubo respuesta inmune contra un antígeno particular
- 25 antes de la inducción o puede indicar que hubo un nivel basal de respuesta inmune contra un antígeno particular antes de la inducción, que fue mejorado después de la inducción. Por lo tanto, "induce [o que induce] una respuesta inmunitaria" incluye "potencia [o que potencia] una respuesta inmunitaria".

- El término "inmunoterapia" se refiere al tratamiento de una enfermedad o afección induciendo
- 30 o potenciando una respuesta inmunitaria. El término "inmunoterapia" incluye inmunización con antígenos o vacunación con antígenos.

Los términos "inmunización" o "vacunación" describen el proceso de administrar un antígeno a un individuo con el propósito de inducir una respuesta inmune, por ejemplo, por razones terapéuticas o profilácticas.

En una modalidad, la presente divulgación contempla modalidades en las que se administran

5 partículas lipoplejo de ARN como se describe en el presente documento que se dirigen al tejido del bazo. El ARN codifica un péptido o proteína que comprende un antígeno o un epítipo como se describe, por ejemplo, en este documento. El ARN es captado por las células presentadoras de antígenos del bazo, como las células dendríticas, para expresar el péptido o la proteína. Después del procesamiento y la presentación opcionales por parte de las células presentadoras
10 de antígeno, se puede generar una respuesta inmune contra el antígeno o epítipo resultante. en un tratamiento profiláctico y/o terapéutico de una enfermedad que involucra al antígeno o epítipo. En una modalidad, la respuesta inmune inducida por las partículas de ARN lipoplejo descritas en este documento comprende la presentación de un antígeno o fragmento del mismo, como un epítipo, por células presentadoras de antígeno, como células dendríticas y/o
15 macrófagos, y activación de células T citotóxicas debido a esta presentación. Por ejemplo, los péptidos o proteínas codificados por los ARN o sus productos de procesamiento pueden presentarse mediante proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) expresadas en células presentadoras de antígenos. El complejo de péptidos MHC puede entonces ser reconocido por células inmunes como las células T o las células B, lo que lleva a
20 su activación.

Por tanto, en una modalidad, el ARN de las partículas lipoplejo de ARN descritas en el presente documento, después de la administración, se administra al bazo y/o se expresa en el bazo. En una modalidad, las partículas de ARN lipoplejo se administran al bazo para activar las células presentadoras de antígeno esplénico. Por tanto, en una modalidad, después de la administración
25 de las partículas lipoplejo de ARN se produce el suministro de ARN y/o la expresión de ARN en células presentadoras de antígenos. Las células presentadoras de antígenos pueden ser células presentadoras de antígenos profesionales o células presentadoras de antígenos no profesionales. Las células presentadoras de antígenos profesionales pueden ser células dendríticas y/o macrófagos, incluso más preferiblemente células dendríticas esplénicas y/o
30 macrófagos esplénicos.

Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a partículas de ARN lipoplejo o una composición farmacéutica que comprende partículas de ARN lipoplejo como se describe en el

presente documento para inducir o potenciar una respuesta inmune, preferiblemente una respuesta inmune contra el cáncer.

En una modalidad adicional, la presente divulgación se refiere a partículas de ARN lipoplejo o una composición farmacéutica que comprende partículas de ARN lipoplejo como se describe en el presente documento para su uso en un tratamiento profiláctico y/o terapéutico de una enfermedad que implica un antígeno, preferiblemente una enfermedad cancerosa.

En una modalidad adicional, la presente divulgación se refiere a un método para administrar un antígeno o un epítipo de un antígeno a células presentadoras de antígenos, tales como células presentadoras de antígenos profesionales, en el bazo, o que expresan un antígeno o un epítipo de un antígeno en un antígeno. células presentadoras, tales como células presentadoras de antígenos profesionales, en el bazo que comprenden la administración a un sujeto de partículas lipoplejo de ARN o una composición farmacéutica que comprende partículas lipoplejo de ARN como se describe en el presente documento. En una modalidad, el antígeno es un antígeno tumoral. En este aspecto, el antígeno o un epítipo de un antígeno está codificado preferiblemente por el ARN en las partículas lipoplejo de ARN.

En una modalidad, la administración sistémica de partículas de ARN lipoplejo o una composición farmacéutica que comprende partículas de ARN lipoplejo como se describe en este documento da como resultado el direccionamiento y/o acumulación de las partículas de ARN lipoplejo o ARN en el bazo y no en el pulmón y/o el hígado. En una modalidad, las partículas de ARN lipoplejo liberan ARN en el bazo y/o entran en las células del bazo. En una modalidad, la administración sistémica de partículas de ARN lipoplejo o una composición farmacéutica que comprende partículas de ARN lipoplejo como se describe en el presente documento suministra el ARN a las células presentadoras de antígeno en el bazo. En una modalidad específica, las células presentadoras de antígeno en el bazo son células dendríticas o macrófagos.

En una modalidad adicional, la presente divulgación se refiere a un método para inducir o potenciar una respuesta inmune en un sujeto que comprende administrar al sujeto partículas lipoplejo de ARN o una composición farmacéutica que comprende partículas lipoplejo de ARN como se describe en el presente documento. En una modalidad ejemplar, la respuesta inmune es contra el cáncer.

El término "macrófago" se refiere a un subgrupo de células fagocíticas producidas por la diferenciación de monocitos. Los macrófagos que se activan por inflamación, citocinas inmunes o productos microbianos engloban y matan de manera inespecífica patógenos extraños dentro

del macrófago mediante un ataque hidrolítico y oxidativo que da como resultado la degradación del patógeno. Los péptidos de las proteínas degradadas se muestran en la superficie de las células de los macrófagos, donde pueden ser reconocidos por las células T, y pueden interactuar directamente con los anticuerpos en la superficie de las células B, lo que da como resultado la

5 activación de las células T y B y una mayor estimulación de la respuesta inmune. Los macrófagos pertenecen a la clase de células presentadoras de antígenos. En una modalidad, los macrófagos son macrófagos esplénicos.

El término "célula dendrítica" (DC por sus siglas en inglés) se refiere a otro subtipo de células fagocíticas que pertenecen a la clase de células presentadoras de antígenos. En una modalidad,

10 las células dendríticas se derivan de células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea. Estas células progenitoras se transforman inicialmente en células dendríticas inmaduras. Estas células inmaduras se caracterizan por una alta actividad fagocítica y un bajo potencial de activación de las células T. Las células dendríticas inmaduras muestrean constantemente el entorno circundante en busca de patógenos como virus y bacterias. Una vez que entran en

15 contacto con un antígeno presentable, se activan en células dendríticas maduras y comienzan a migrar al bazo o al ganglio linfático. Las células dendríticas inmaduras fagocitan patógenos y degradan su proteínas en trozos pequeños y al madurar presentar esos fragmentos en su superficie celular usando MHC moléculas. Simultáneamente, regulan positivamente los receptores de la superficie celular que actúan como co-receptores en la activación de células T

20 como CD80, CD86, y CD40 mejorando en gran medida su capacidad para activar las células T. También regulan al alza CCR7, un receptor quimiotáctico que induce a la célula dendrítica a viajar a través del sangre corriente a la bazo oa través del sistema linfático a un ganglio linfático. Aquí actúan como células presentadoras de antígenos y activar células T auxiliares y células T asesinas al igual que Células B presentándoles antígenos, junto con señales coestimuladoras no

25 específicas de antígeno. Por tanto, las células dendríticas pueden inducir activamente una respuesta inmunitaria relacionada con las células T o B. En una modalidad, las células dendríticas son células dendríticas esplénicas.

El término "célula presentadora de antígeno" (APC por sus siglas en inglés) es una célula de una variedad de células capaces de mostrar, adquirir y/o presentar al menos un antígeno o

30 fragmento antigénico sobre (o en) su superficie celular. Las células presentadoras de antígenos se pueden distinguir en células presentadoras de antígenos profesionales y células presentadoras de antígenos no profesionales.

El término "células presentadoras de antígenos profesionales" se refiere a células presentadoras de antígenos que expresan constitutivamente las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II (MHC de clase II) necesarias para la interacción con células T vírgenes. Si una célula T interactúa con el complejo de moléculas MHC de clase II en la
5 membrana de la célula presentadora de antígeno, la célula presentadora de antígeno produce una molécula coestimuladora que induce la activación de la célula T. Las células presentadoras de antígenos profesionales comprenden células dendríticas y macrófagos.

El término "células presentadoras de antígenos no profesionales" se refiere a células presentadoras de antígenos que no expresan constitutivamente moléculas de MHC de clase II,
10 pero tras la estimulación por ciertas citocinas tales como interferón-gamma. Las células presentadoras de antígenos no profesionales ejemplares incluyen fibroblastos, células epiteliales tímicas, células epiteliales tiroideas, células gliales, células beta pancreáticas o células endoteliales vasculares.

"Procesamiento de antígenos" se refiere a la degradación de un antígeno en productos de la
15 procesión, que son fragmentos de dicho antígeno (p. ej., la degradación de una proteína en péptidos) y la asociación de uno o más de estos fragmentos (p. ej., mediante unión) con MHC. moléculas para la presentación por las células, como las células presentadoras de antígenos a células T específicas.

El término "enfermedad que implica un antígeno" o "enfermedad que implica un epítipo" se
20 refiere a cualquier enfermedad que implica un antígeno o epítipo, por ejemplo, una enfermedad que se caracteriza por la presencia de un antígeno o epítipo. La enfermedad que involucra un antígeno o epítipo puede ser una enfermedad infecciosa o una enfermedad cancerosa o simplemente cáncer. Como se mencionó anteriormente, el antígeno puede ser un antígeno asociado a una enfermedad, tal como un antígeno asociado a un tumor, un antígeno viral o un
25 antígeno bacteriano y el epítipo puede derivarse de dicho antígeno.

El término "enfermedad infecciosa" se refiere a cualquier enfermedad que puede transmitirse de un individuo a otro o de un organismo a otro, y está causada por un agente microbiano (por ejemplo, un resfriado común). Las enfermedades infecciosas son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, una enfermedad viral, una enfermedad bacteriana o una enfermedad
30 parasitaria, enfermedades causadas por un virus, una bacteria y un parásito, respectivamente. En este sentido, la enfermedad infecciosa puede ser, por ejemplo, hepatitis, enfermedades de transmisión sexual (p. ej., Clamidia o gonorrea), tuberculosis, VIH/síndrome de

inmunodeficiencia adquirida (SIDA), difteria, hepatitis B, hepatitis C, cólera, enfermedades respiratorias agudas graves. síndrome (SARS), la gripe aviar y la influenza.

Los términos "enfermedad cancerosa" o "cáncer" se refieren o describen la condición fisiológica en un individuo que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cánceres incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Más particularmente, los ejemplos de tales cánceres incluyen cáncer de hueso, cáncer de sangre, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de recto, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de útero, carcinoma de los órganos sexuales y reproductivos, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de glándula paratiroidea, cáncer de glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, carcinoma de pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), cáncer neuroectodérmico, tumores del eje espinal, glioma, meningioma y adenoma hipofisario. El término "cáncer" según la divulgación también comprende metástasis de cáncer.

Las estrategias de combinación en el tratamiento del cáncer pueden ser deseables debido al efecto sinérgico resultante, que puede ser considerablemente más fuerte que el impacto de un enfoque monoterapéutico. En una modalidad, la composición farmacéutica se administra con un agente inmunoterapéutico. Como se usa en este documento, "agente inmunoterapéutico" se refiere a cualquier agente que pueda estar involucrado en la activación de una respuesta inmune específica y/o función (es) efectora inmune. La presente divulgación contempla el uso de un anticuerpo como agente inmunoterapéutico. Sin desear estar obligado por la teoría, los anticuerpos son capaces de lograr un efecto terapéutico contra las células cancerosas a través de varios mecanismos, que incluyen la inducción de apoptosis, el bloqueo de componentes de las vías de transducción de señales o la inhibición de la proliferación de células tumorales. En determinadas formas de modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo monoclonal puede inducir la muerte celular a través de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), o unirse a proteínas del complemento, lo que conduce a una toxicidad celular directa, conocida como citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Los ejemplos no limitantes de anticuerpos anti-cáncer y posibles dianas de anticuerpos (entre paréntesis) que pueden usarse en combinación con la presente divulgación incluyen: Abagovomab (CA-125), Abciximab (CD41), Adecatumumab (EpCAM), Afutuzumab (CD20),

Alacizumab pegol (VEGFR2), pentetato de Altumomab (CEA), Amatuximab (MORAb-009), Anatumomab mafenatox, (TAG-72) HLA-DR), Arcitumomab (CEA), Atezolizumab (PD-L1), Bavituximab (fosfatidilserina), Bectumomab (CD22), Belimumab (BAFF), Bevacizumab (VEGF-A), Bivatuzumab mertansina (CD44), Blin 19 Brentuximab vedotin (CD30 TNFRSF8),

5 Cantuzumab mertansin (mucina CanAg), Cantuzumab ravtansine (MUC1), Capromab pendetide (células de carcinoma de próstata), Carlumab (CNT0888), Catumaxomab (EpCAM, CDUximab) (Cetuximab) (Cetuximab) (Cetuximab) (Cetuximab) IGF-1), Claudiximab (Claudin), Clivatuzumab tetraxetan (MUC1), Conatumumab (TRAIL-R2), Dacetuzumab (CD40), Dalotuzumab (receptor del factor de crecimiento similar a la insulina I), Denosumab

10 (RANKL), Detumomab (linfoma B celular), Drozitumab (DR5), Ecomeximab (gangliósido GD3), Edrecolomab (EpCAM), Elotuzumab (SLAMF7), Enavatuzumab (PDL192), Ensituximab (NPC-1C), Epratuzumab (CD22), Ertumaxomab (HER2/neu, CD3), Etaracizumab (integrina $\alpha v \beta 3$), Farletuzumab (receptor de folato 1), FBTA05 (CD20), Ficlaturuzumab (SCH 900105), Figitumumab (IGF-1)), Flanvotumab (glucoproteína 75),

15 Fresolimumab (TGF- β), Galiximab (CD80), Ganitumab (IGF-I), Gemtuzumab ozogamicina (CD33), Gevokizumab (IL-I β), Girentuximab (anhidrasa carbónica 9 (CA-I)), Glematumumab vedotin (GPNMB), Ibritumomab tiuxetan (CD20), Icrucumab (VEGFR-1), Igovoma (CA-125), Indatuximab ravtansine (SDC1), Intetumumab (CD51), Inotuzumab ozogapilimum (CD30) Igogamicina (CD22)), Labetuzumab (CEA), Lexatumumab (TRAIL-

20 R2), Libivirumab (antígeno de superficie de la hepatitis B), Lintuzumab (CD33), Lorvotuzumab mertansina (CD56), Lucatumumab (CD40), Lumiliximab (CD23), Mapatum - R1), Matuzumab (EGFR), Mepolizumab (IL-5), Milatuzumab (CD74), Mitumomab (gangliósido GD3), Mogamulizumab (CCR4), Moxetumomab pasudotox (CD22), Nacolomab tafenatox (antígeno C242), Napt (5T4), Namatumab (RON), Necitumumab (EGFR),

25 Nimotuzumab (EGFR), Nivolumab (IgG4), Ofatumumab (CD20), Olaratumab (PDGF-R a), Onartuzumab (quinasa del receptor del factor de dispersión humano), Oportuzumab monatox), Oregovomab (CA-125), Oxelumab (OX-40), Panitumumab (EGFR), Patritumab (HER3), Pentumoma (MUC1), Pertuzuma (HER2/neu), Pintumomab (antígeno de adenocarcinoma), Pritumumab (vumabimentina), Racotumina (Ácido N-glicolilneuramínico), Radretumab

30 (fibronectina extra dominio B), Rafivirumab (glucoproteína del virus de la rabia), Ramucirumab (VEGFR2), Rilotumumab (HGF), Rituximab (CD20), Robatumumab (receptor de IGF-1), Samalumaiz (Sibrotuzumab) FAP), siltuximab (IL-6), tabalumab (BAFF), tacatuzumab tetraxetan (alfa-fetoproteína), taplitumomab paptox (CD 19), tenatumomab

(tenascina C), teprotumumab (CD221), ticilimumab (CD221), tigatuzumab R2), TNX-650 (IL-13), Tositumomab (CD20), Trastuzumab (HER2/neu), TRBS07 (GD2), Tremelimumab (CTLA-4), Tucotuzumab celmoleucina (EpCAM), Ublituximab), Urelu mab (4-1 BB), Volociximab (integrina $\alpha 5\beta 1$), Votumumab (antígeno tumoral CTAA 16.88), Zalutumumab (EGFR) y Zanolimumab (CD4).

En una modalidad, el agente inmunoterapéutico es un antagonista de unión al eje PD-1. Un antagonista de unión al eje de PD-1 incluye, pero no se limita a, un antagonista de unión a PD-1, un antagonista de unión a PD-L1 y un antagonista de unión a PD-L2. Los nombres alternativos para "PD-1" incluyen CD279 y SLEB2. Los nombres alternativos para "PD-L1" incluyen B7-H1, B7-4, CD274 y B7-H. Los nombres alternativos para "PD-L2" incluyen B7-DC, Btdc y CD273. En algunas modalidades, el antagonista de unión de PD-1 es una molécula que inhibe la unión de PD-1 a sus compañeros de unión de ligandos. En un aspecto específico, los socios de unión del ligando PD-1 son PD-L1 y/o PD-L2. En otra modalidad, un antagonista de la unión de PD-L1 es una molécula que inhibe la unión de PD-L1 a sus compañeros de unión.

En una modalidad específica, los socios de unión de PD-L1 son PD-1 y/o B7-1. En otra modalidad, el antagonista de la unión de PD-L2 es una molécula que inhibe la unión de PD-L2 a sus compañeros de unión. En una modalidad específica, la pareja de unión de PD-L2 es PD-1. El antagonista de unión a PD-1 puede ser un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno del mismo, una inmunoadhesina, una proteína de fusión u oligopéptido. En algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 (por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico). Los ejemplos de un anticuerpo anti-PD-1 incluyen, sin limitación, MDX-1106 (Nivolumab, OPDIVO), Merck 3475 (MK-3475, Pembrolizumab, KEYTRUDA), MEDI-0680 (AMP-514), PDR001, REGN2810, BGB- 108 y BGB-A317.

En una modalidad, el antagonista de unión a PD-1 es una inmunoadhesina que incluye una porción extracelular o de unión a PD-1 de PD-L1 o PD-L2 fusionada a una región constante. En una modalidad, el antagonista de unión a PD-1 es AMP-224 (también conocido como B7-DCIg, es un PD-L2-Fc), que es un receptor soluble en fusión descrito en los documentos WO2010/027827 y WO2011/066342.

En una modalidad, el antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1, que incluye, sin limitación, YW243.55.S70, MPDL3280A (Atezolizumab), MEDI4736 (Durvalumab), MDX-1105 y MSB0010718C (Avelumab).

En una modalidad, el agente inmunoterapéutico es un antagonista de unión a PD-1. En otra modalidad, el antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1. En una modalidad ejemplar, el anticuerpo anti-PD-L1 es atezolizumab.

- 5 La cita de documentos y estudios a los que se hace referencia en este documento no pretende ser una admisión de que cualquiera de los anteriores sea técnica anterior pertinente. Todas las declaraciones con respecto al contenido de estos documentos se basan en la información disponible para los solicitantes y no constituyen ninguna admisión en cuanto a la exactitud del contenido de estos documentos.

10

La siguiente descripción se presenta para permitir a un experto en la técnica realizar y utilizar las diversas modalidades. Las descripciones de dispositivos, técnicas y aplicaciones específicas se proporcionan solo como ejemplos. Varias modificaciones de los ejemplos descritos en el presente documento resultarán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica, y los principios generales definidos en el presente documento pueden aplicarse a otros ejemplos y aplicaciones sin apartarse del espíritu y alcance de las diversas modalidades. Por tanto, no se pretende que las diversas modalidades se limiten a los ejemplos aquí descritos y mostrados, sino que se les debe conceder el alcance consistente con las reivindicaciones.

15

20 Ejemplos

Ejemplo 1: Materiales

Los materiales notables utilizados para los experimentos descritos a continuación fueron:

Material	Empresa. No. De Artículo
R-DOTMA	Merck & Cie. 5000249.2900-10G
DOPE	CordenPharma. LP-04-069
Etanol abs.	VWR chemicals. 20821.365
Agua	Aqua B. Brown. 0082479E
Minisart 0.45 µm	Sartorius Stedim. 16555-K
Minisart 0.8 µm	Sartorius Stedim. 17593-K
Minisart 1.2 µm	Sartorius Stedim. 17593-K
Minisart 5 µm	Sartorius Stedim. 17594-K

BD microlanza 3	0.9x40mm. 301300
Injekt-F 1 ml	B. Braun. 9166017V
Solución de NaCl 5 M	Ambion. AM9760G
Luc-ARN	ARN que codifica Luciferasa; generado a partir de Biontech RNA Pharmaceuticals

Ejemplo 2: Preparación de mezclas de lípidos.

Mezcla de lípidos DOTMA/DOPE preparada a diferentes concentraciones de lípidos en etanol con una relación molar de lípidos 2:1 respectivamente. La solución se prepara de la siguiente manera:

- 5
 - Pesar el lípido DOPE.
 - Calcular la cantidad de DOTMA para mantener la proporción molar de 2:1 DOTMA/DOPE.
 - Pesar el lípido DOTMA.
 - Calcular la cantidad absoluta de etanol necesaria para disolver los lípidos.
- 10
 - Pesar etanol abs.
 - Disolver los lípidos en etanol con ayuda de agua a 37 °C.

La solubilidad de DOPE y DOPE/DOTMA en etanol se investigó preparando soluciones de DOPE 300 mM o DOPE/DOTMA 330 mM (66:33) en etanol. Los lípidos se disolvieron incubando las soluciones de lípidos a 37 °C durante 20 minutos. Las soluciones de DOPE se centrifugaron a 17000 G durante 1 hora y se midió la concentración de DOPE en el sobrenadante mediante HPLC. Las soluciones de DOTMA/DOPE se filtraron a través de un filtro de jeringa de PES de 0.22 µm y se midió la concentración de lípidos en el filtrado mediante HPLC.

Otras mezclas de lípidos que se pueden preparar igualmente siguiendo las etapas básicas descritas en este ejemplo, siempre que se utilicen otros lípidos como materias primas y/o se calculen otras proporciones molares.

Ejemplo 3: Preparación de Liposomas

Los liposomas se prepararon mediante inyección de etanol de la siguiente manera: Se inyectaron 0.2 ml de DOTM/DOPE o (otra solución lipídica) en etanol con la ayuda de una jeringa de 1 ml equipada con una aguja de 0.9 x 40 mm en 9.8 ml de agua con agitación a 120 rpm. El coloide liposómico se agitó durante 30 minutos. Los liposomas se filtraron o no a través de filtros de jeringa CA de 0.45 o 1.2 o 5 µm. Los coloides de liposomas se almacenaron a

4-8 °C. Las soluciones de lípidos DOTMA/DOPE se prepararon en una relación molar de 66:33% a diferentes concentraciones de lípidos totales, de 100 a 400 mM con pasos intermedios de 50 mM.

5 **Ejemplo 4: Preparación de lipoplejos de ARN**

Las formulaciones de ARN lipoplejo se prepararon como sigue mezclando en primer lugar una solución de ARN (por ejemplo, solución de luc-ARN) con una solución de NaCl para condensar previamente el luc-ARN. Después de esto, el coloide de liposomas y la solución de luc-ARN-NaCl se mezclaron para formar los lipoplejos de ARN. La formulación de ARN lipoplejo se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se almacenó a 4-8°C. Las diferentes formulaciones de ARN lipoplejo se prepararon, por ejemplo, con una relación N/P de 0.65. La concentración de ARN en estas diferentes formulaciones de lipoplejo de ARN fue de 0.1 mg/ml y la concentración de NaCl fue de 50 mM. Se utilizaron diferentes precursores de liposomas (diferentes tamaños) para la preparación de los lipoplejos de ARN.

15

Ejemplo 5: Dispersión dinámica de la luz

Los tamaños de los liposomas y los tamaños de los lipoplejo de ARN se midieron mediante el método conocido de dispersión dinámica de la luz (DLS) usando un instrumento Nicomp (PSS. Santa Bárbara. EE. UU.). Las muestras de liposomas se diluyeron con agua hasta una concentración de lípidos totales de 1 mM. Las muestras de ARN lipoplejo se diluyeron de 1 a 5 con una solución de NaCl al 0.9%. Las muestras se midieron en tubos de cultivo de 5x50 mm (Kimble. EE. UU.).

20

Ejemplo 6: Oscurecimiento de la luz: dispersión dinámica de la luz

El recuento/medición de partículas de los diferentes liposomas y formulaciones de ARN lipoplejo en un intervalo de tamaño entre 0.5 y 5 µm se realizó utilizando un instrumento Accusizer A7000 (PSS. Santa Bárbara. EE. UU.). Se realizaron tres mediciones de un volumen de 5 mL (2.5 µL de muestra/20 mL de agua en partículas libres). Los resultados obtenidos representaron el valor medio de la cantidad de partículas de tres mediciones.

30

Ejemplo 7: Dispersión de rayos X de ángulo pequeño

Los parámetros de la estructura interna de diferentes formulaciones de ARN lipoplejo preparadas con diferentes precursores de liposomas se midieron mediante Dispersión de rayos

X de ángulo pequeño (SAXS por sus siglas en inglés). SAXS es una técnica mediante la cual se pueden cuantificar las diferencias de densidad a nanoescala en una muestra analizando el comportamiento de dispersión elástica de los rayos X cuando viajan a través del material, registrando su dispersión en ángulos pequeños. Se calcularon los parámetros de longitud de correlación y espaciado d para cada formulación de ARN probada. Se prepararon formulaciones de ARN lipoplejo con una relación N/P de 0.65, 0.1 mg/ml de ARN y NaCl 112 mM.

Ejemplo 8: Electroforesis en gel de agarosa

La cantidad de ARN libre en las diferentes muestras de ARN lipoplejo se midió mediante electroforesis en gel. Se utilizó gel de agarosa al 1% que contenía hipoclorito de sodio para realizar las mediciones. Las muestras de ARN lipoplejo se diluyeron 1: 6 con colorante de carga de ADN. Se cargaron cuidadosamente 12 μ L de muestras de ARN lipoplejo diluidas en el gel de agarosa. La electroforesis se realizó a 80 V con un tiempo de ejecución de 40 min.

Ejemplo 9: HPLC

La concentración de lípidos en las diferentes formulaciones de liposomas se midió mediante HPLC (Agilent technologies. Santa Clara. EE. UU.) Utilizando una columna Sunfire C18 de 2.5 μ m 4.6 x 75 mm (Waters. Massachusetts. EE. UU.) Y una longitud de onda de 205 nm. La fase móvil A era una mezcla de metanol al 70%/isopropanol al 30%/TFA al 0.1%, la fase móvil B era una mezcla de metanol al 55%/isopropanol al 15%/agua al 30%/TFA al 0.1%. Las muestras de liposomas se diluyeron o no con agua hasta una concentración total de lípidos de 3 mM.

Ejemplo 10: Cultivo de células: Transfección de ARN en células dendríticas in vitro

Se prepararon formulaciones de ARN lipoplejo con diferentes precursores de liposomas y luc-ARN. Los lipoplejos de ARN se diluyeron a 0.01 mg/ml de ARN con una solución de NaCl al 0.9% para experimentos de cultivo celular. Se investigó la eficacia de transfección de ARN de las diferentes formulaciones de ARN lipoplejo en células dendríticas humanas sembradas en medio o sangre completa.

Ejemplo 11: Modelo animal: direccionamiento del bazo y transfección de ARN en células dendríticas

Se investigó la eficacia de transfección de diferentes formulaciones de ARN lipoplejo en ratones BALB/c. Se inyectaron retroorbitalmente 20 µg de lipoplejos de ARN formulados y se midió la expresión de luciferasa en células dendríticas (diana del bazo) después de 6 horas. Se prepararon lipoplejos de ARN con luc-ARN y diferentes precursores de liposomas, liposomas pequeños o grandes obtenidos a partir de coloides crudos y liposomas pequeños y grandes después de filtración de 0.45 µm, relación N/P 0.65 y NaCl 112 mM.

Ejemplo 12: Prueba de solubilidad

Se ha probado si se pueden preparar soluciones que contienen DOPE de mayor concentración (en estado sobresaturado) y utilizarlas para etanol. inyección para la fabricación de liposomas (siguiente sección). Los resultados obtenidos en esta serie de pruebas de solubilidad se muestran en las Tablas 1 y 2:

Solubilidad de DOPE en etanol

Proveedor	Cargo No.	mM
Corden Pharma	F0624	56
Corden Pharma	W0650	59
NOF	14099612	63
Merck	MK2885-C	59

Tabla 1: Solubilidad del lípido DOPE en etanol obtenido de diferentes proveedores.

Solubilidad de DOPE en etanol que comprende 220 mM de DOTMA

	Proveedor	Cargo No.	mM después de la filtración
5	Corden Pharma	F0624	93
	Corden Pharma	W0650	106
	NOF	14099612	103
	Merck	MK2885-C	94

10

Tabla 2: Aumento de la solubilidad del lípido DOPE en una mezcla de lípidos DOTMA/DOPE con una relación molar % de 66:33 preparada en etanol abs.

De acuerdo con estos resultados, DOPE comprado a diferentes proveedores tiene una solubilidad en equilibrio en etanol de aproximadamente 50 a 60 mM (temperatura ambiente). Sin embargo, si se prepara una co-solución con el lípido catiónico DOTMA, la solubilidad en equilibrio aumenta significativamente, por ejemplo a aproximadamente 90 a 100 mM si se usa una co-solución de DOTMA/DOPE con una relación molar de 66:33.

Ejemplo 13: Fabricación de liposomas de diferentes tamaños.

Los liposomas se fabricaron mediante inyección de etanol usando el protocolo descrito en el Ejemplo 3. No se realizó ningún proceso de filtración después de la inyección de etanol. Se varió la concentración de lípidos en etanol, manteniendo todos los demás parámetros fijos. Los tamaños de los liposomas y se midieron como se describe por Dispersión de luz dinámica (DLS) en los Ejemplos 5 y 6.

25

Como ejemplo, los resultados relacionados con los liposomas obtenidos a partir de una mezcla de DOTMA/DOPE con una relación molar en % 66:33 se muestran en la Tabla 3 (a continuación) y las Figuras 1 y 2.

30

Sol. stock de lípidos mM	Tamaño de liposoma (nm) coloide crudo			Tamaño estadístico	
	1	2	3	$\bar{X}$	σ
100	28	32		30	2.83
150	36	35	34	35	1 ⁵
200	82	76	74	76	4.16
250	202	195	194	195	4.36
300	371	220	369	369	86.61
350	620	644	652	644	16.65
400	665	665	740	665	43.3 ¹⁰
450	721	783	723	723	35.23
500	739	767	766	766	15.89
550	770	754	656	754	61.72

15 **Tabla 3: Dependencia de los tamaños de los liposomas en diferentes concentraciones de lípidos en la solución stock.**

Como puede verse, los tamaños obtenidos (promedio $\bar{Z}$) de los liposomas aumentan con la concentración de lípidos en la solución de etanol utilizada para la inyección de etanol. Por tanto, la concentración de lípidos en etanol se puede utilizar eficazmente para controlar el tamaño de los liposomas. Curiosamente, el cambio de tamaño fue más prominente si la concentración de DOPE estaba por debajo y por encima de la solubilidad de equilibrio de DOPE en etanol solo. Si la concentración de DOPE estaba por encima de 50 mM (concentración de lípidos totales de 150 mM), el tamaño del liposoma obtenido aumentaba drásticamente, de <50 nm a más de un 500 nm (Figura 1). Sin embargo, también por encima del límite de solubilidad, el tamaño de los liposomas aumenta de forma monótona con el aumento de la concentración de lípidos. En todas las formulaciones de liposomas estaba presente una fracción de liposomas de 0.5 μm , esta fracción de liposomas era mayor en los liposomas preparados con una solución de lípidos 300 mM y disminuía en los liposomas preparados a concentraciones de lípidos más bajas y más altas. Además, se midieron fracciones de liposomas de 0.6 μm y 0.7 μm en las formulaciones de liposomas preparadas a niveles de lípidos superiores concentraciones (Figura 2). Después de la inyección de etanol de una solución de lípidos altamente concentrada, se formaron liposomas más grandes. La cantidad total de liposomas formados fue menor en comparación con las

formulaciones de liposomas preparadas a baja concentración de lípidos en la solución de lípidos. Los resultados obtenidos representaron el valor medio de la cantidad de partículas de tres mediciones.

5 Ejemplo 14: Fabricación de lipoplejos de ARN a partir de liposomas de diferentes tamaños

Lipop de ARNSe fabricaron lexes como se describe en el Ejemplo 4 utilizando diferentes precursores de liposomas, donde se varió el tamaño de los liposomas para su formación, manteniendo todos los demás parámetros fijos. Los tamaños de los liposomas (media z) y los índices de polidispersidad (PDI) se determinaron en el transcurso de experimentos de dispersión dinámica de luz (DLS) como se describe en los ejemplos 5 y 6.

En Tabla 4 (abajo) y Figuras 3 y 4 correspondientes.

Mediciones de tamaño de ARN lipoplejo										
Sol lipídica	Promedio Z (nm)			PDI			Estadística promedio Z (nm)		Estadística PDI	
mM	1	2	3	1	2	3	Ā	Desv. Std.	Ā	Desv. Std.
100	196	200	190	0.136	0.171	0.186	195.07	4.82	0.16	0.03
150	208	220	187	0.3	0.165	0.17	205.03	17.04	0.21	0.08
200	189	207	212	0.093	0.125	0.14	202.43	11.81	0.12	0.02
250	208	282	270	0.3	0.203	0.202	253.17	39.61	0.24	0.06
300	473	476	475	0.432	0.372	0.356	474.7	1.41	0.39	0.04
350	448	479	485	0.294	0.407	0.402	470.83	19.99	0.37	0.06
400	465	447	415	0.424	0.295	0.292	442.03	25.29	0.34	0.08
450	412	447	434	0.338	0.312	0.311	431.2	17.66	0.32	0.02
500	448	443	419	0.401	0.312	0.333	436.73	15.62	0.35	0.05
550	434	470	417	0.316	0.46	0.294	440.43	27.29	0.36	0.09

15 **Tabla 4: Cantidad de partículas presentes en las formulaciones de ARN lipoplejo preparadas con diferentes precursores de liposomas (liposomas no filtrados). La cantidad de partículas de 0.5 μ m aumenta en las formulaciones de ARN lipoplejo preparadas con liposomas más grandes. Los liposomas se prepararon mediante inyección de etanol utilizando diferentes soluciones madre de lípidos a diferentes**

concentraciones. El tamaño de los liposomas aumenta con la concentración de lípidos en la solución stock.

Según esta serie de pruebas, los lipoplejos de ARN obtenidos de liposomas pequeños eran más pequeños que los de liposomas grandes. Los lipoplejos de ARN obtenidos a partir de liposomas que se fabricaron con una solución de 300 mM y superiores eran aproximadamente dos veces más grandes que los de los liposomas que se obtuvieron a partir de una solución de reserva de 150 mM. Sin correlación entre lipoSe encontró cierto tamaño y tamaño de lipoplejo de ARN en todos los lipoplejos de ARN preparados con liposomas más grandes (Figura 3).

La cantidad obtenida de ARN-lipoplejo aumentó con el tamaño del liposoma utilizado para su formación. Se midieron cantidades mayores de partículas de ARN-lipoplejos más grandes en las formulaciones preparadas con liposomas más grandes, lo que confirma los datos obtenidos de las medidas de dispersión dinámica de la luz (Figura 4). Los resultados obtenidos representaron el valor promedio de la cantidad de partículas de tres mediciones.

Ejemplo 15: Dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) de diferentes lipoplejos

Se realizaron experimentos de dispersión de rayos X de ángulo pequeño como se describe con lipoplejos de ARN obtenidos de liposomas de soluciones madre concentradas de manera diferente. Por ejemplo, los lipoplejos de ARN se formaron a partir de liposomas DOTMA/DOPE 2/1 (mol/mol) y ARN en una relación de carga de 1.3 a 2. Los liposomas se fabricaron mediante inyección de etanol como se describe a partir de concentraciones de lípidos en etanol de 100 mM, 300 mM y 400 mM.

Las curvas de difracción obtenidas a partir de medidas de dispersión de rayos X de ángulo pequeño a partir de lipoplejos de ARN formados con liposomas preparados a una relación de carga de 4/1 (arriba) y a una relación de carga de 1.3/2, donde los liposomas para la formación de lipoplejo se obtuvieron con mM solución madre de lípidos en etanol de 400 mM, 300 mM y 100 mM, se muestran en la Figura 5.

Los patrones de dispersión comprenden un solo pico de Bragg a aproximadamente 1 nm^{-1} . Este es el patrón de difracción típico para el bazo que se dirige a lipoplejos donde se utilizó un exceso de ARN (cargado negativamente) para la formación de lipoplejo. Si los lipoplejos no están cargados negativamente, el perfil de dispersión es completamente diferente. Como ejemplo, se midieron los lipoplejos de ARN en una relación de carga $\pm 4/1$, donde se encuentran picos mucho menos pronunciados. También se percibe un pico de segundo orden (aunque de baja

intensidad). De hecho, la característica general de los perfiles de dispersión de rayos X de los lipoplejos es que hay varios picos que pueden ser equidistantes o pueden tener otros espaciamentos, dependiendo del estado de fase. Aquí. Por el contrario, solo se determina un único pico. Además, la anchura del pico cambia dependiendo de la concentración de la solución madre que se utilizó originalmente para la fabricación de liposomas. Si la concentración en etanol fue mayor, el ancho de pico fue menor. El pico de Bragg indica que los lipoplejos se ordenan regularmente, donde la distancia de repetición (espaciado d) se da desde la posición del pico como:

$$d = \frac{n \cdot 2\pi}{q_{\max(n)}} \quad (1)$$

Aquí q es la transferencia de impulso, con $q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta$, con n el orden y $q_{\max}$ la posición máxima del respectivo pico de Bragg, λ la longitud de onda, y θ el ángulo. El espaciamento d que se puede derivar de los picos de Bragg es del orden de 6.5 nm.

El ancho del pico, Δq , disminuye al aumentar el número de unidades repetidas en la pila. Para una matriz de cristal líquido, la longitud de correlación se puede dar como:

$$\xi = \frac{2}{\Delta q} \quad (2)$$

Para el producto lipoplejo aquí, se puede derivar una clara correlación del patrón de dispersión con la concentración de lípidos antes mencionada en etanol para la fabricación de liposomas y la actividad biológica. Si bien la posición del pico es invariante, el ancho del pico cambia monótonamente con la concentración de lípidos aplicada en etanol. El aumento de la concentración de lípidos en el etanol (que conduce a un aumento del tamaño de los liposomas) corresponde a una disminución del ancho del pico y, por lo tanto, a una mayor longitud de correlación. Al mismo tiempo, la actividad biológica aumenta al aumentar la duración de la correlación. Por tanto, los lipoplejos descritos con actividad mejorada, que se fabrican a partir de liposomas para los que se utilizó la solución madre de lípidos de mayor concentración en etanol para la fabricación, pueden discernirse por una característica estructural clara. Además, también por otros métodos, como el fraccionamiento de flujo de campo asimétrico (AF4), los lipoplejos descritos con actividad mejorada pueden distinguirse de los de actividad más baja.

Ejemplo 16: Eficiencia de transfección de lipoplejos de ARN en células dendríticas humanas

Los lipoplejos de Luc-RNA se fabricaron como se describe utilizando diferentes precursores de liposomas, donde se varió el tamaño de los liposomas para su formación (variando la

concentración de lípidos de partida para su formación), manteniendo todos los demás parámetros fijos. Posteriormente, se investigó la eficacia de la transfección de ARN de las diferentes formulaciones de ARN lipoplejo en células dendríticas humanas sembradas en medio o sangre completa.

- 5 Resultados que ilustran la eficiencia de transfección in vitro (células dendríticas humanas) determinada midiendo la expresión de luciferasa y la correspondiente actividad biológica de diferentes lipoplejos de ARN preparados con diferentes precursores de liposomas se muestra en la Figura 6.

La actividad biológica (transfección de ARN in vitro) aumenta monótonamente con la longitud de correlación de los lipoplejos de ARN. Una longitud de correlación más alta indica una población más homogénea de bicapas lipídicas en el lipoplejo de ARN.

Ejemplo 17: Fraccionamiento de flujo de campo de flujo asimétrico de diferentes lipoplejos

- 15 El fraccionamiento de flujo de campo de flujo asimétrico (AF4), hoy en día un método común y de vanguardia para el fraccionamiento y separación de partículas en una suspensión, se utilizó para determinar diferencias adicionales de lipoplejos de ARN. Según la teoría AF4, las partículas con propiedades similares e igual tamaño deberían eluir al mismo tiempo.

Algunos resultados relacionados con las mediciones de AF4 de lipoplejos de dos tipos diferentes de liposomas, ya sea de fabricación de una solución madre 150 mM en etanol, o de una solución madre 400 mM en etanol se muestran en la Figura 7.

- En resumen, las mediciones del fraccionamiento de flujo de campo demuestran que los lipoplejos de liposomas de una concentración de lípidos de 150 mM en etanol son cualitativa y cuantitativamente diferentes de los de una concentración de lípidos de 400 mM. Los lipoplejos derivados de 150 mM son más pequeños pero, contrariamente a la intuición, eluyen más tarde, por lo que debe haber una diferencia cualitativa (forma, interacciones del medio, carga) entre los dos restos. Los lipoplejos de ARN de la solución de etanol 150 mM eluyen más tarde, aunque son de menor tamaño. Esto indica que los lipoplejos de ARN de liposomas que se fabrican a partir de liposomas en los que se usó una solución de lípidos 150 mM en etanol son en promedio más pequeños que los de lípidos 400 mM en etanol. Incluso con el mismo tamaño, los lipoplejos derivados de 150 mm tienen propiedades fisicoquímicas diferentes a los derivados de 400 mM. Estas diferencias de tamaño y propiedades fisicoquímicas se correlacionan con la mayor actividad biológica de los lipoplejos de ARN derivados de 400 mM.

Ejemplo 18: Actividad biológica de los lipoplejos de ARN in vitro

Según lo determinado por cultivo celular experimentos de transfección (células dendríticas) con lipoplejos de ARN que codifican luciferasa de diferentes tamaños preparados a partir de liposomas, diferentes soluciones madre de lípidos y/o diferentes concentraciones de lípidos como se describe, las señales de luciferasa y por lo tanto las actividades biológicas aumentan monótonamente con la concentraciones iniciales de lípidos y, por tanto, con los tamaños de liposomas utilizados para la formación de lipoplejo de ARN. Los resultados correspondientes se muestran en la Fig.ures 6, 8 y 9.

En resumen, los lipoplejos de ARN generados a partir de concentraciones de lípidos más altas para la fabricación de liposomas exhiben una actividad significativamente mayor in vitro.

Ejemplo 19: Actividad biológica de los lipoplejos de ARN in vivo

Según lo determinado por experimentos de transfección de cultivos celulares (células dendríticas) con lipoplejos de ARN que codifican luciferasa preparados a partir de liposomas de diferentes tamaños, los lipoplejos de ARN preparados con liposomas más grandes dan como resultado una expresión de luciferasa significativamente mayor. y actividad biológica correspondiente.

Un ejemplo no limitativo de esta serie de pruebas se muestra en las Figuras 10 y 11. Los lipoplejos de ARN preparados con liposomas más grandes de un coloide crudo 360 mM conducen a una señal de expresión in vivo significativamente mayor que los lipoplejos de ARN pequeños de un coloide crudo 200 mM.

Ejemplo 20: Fabricación automatizada de lipoplejos de ARN

Para la fabricación automatizada por lotes de lipoplejos de ARN, se ha desarrollado un procedimiento de aplicación general que se muestra en Figura 12. Todos los pasos se llevan a cabo utilizando una vía de fluido preesterilizada de un solo uso que permite una manipulación aséptica segura de los materiales. Primero, la concentración del ARN se ajusta a la concentración de liposomas y se agrega NaCl para la condensación del ARN. De ese modo, la solución de ARN se ajusta a una concentración de ARN que permite mezclar volúmenes idénticos de ARN y liposomas. Tanto el ARN como la solución de liposomas se transfieren a jeringas de gran volumen y ambas jeringas se montan en una sola bomba de jeringa que acciona simultáneamente los dos pistones de las jeringas. Después de la formación de lipoplejo de ARN, se agrega una solución crioprotectora y se ajusta la concentración final del medicamento.

Después de llenar el medicamento en botellas de vidrio, el medicamento se congela como un concentrado para su almacenamiento a largo plazo.

Un atributo de calidad crítico de los lipoplejos de ARN es la relación de carga ajustada por la relación de mezcla entre el ARN y los liposomas. Se desarrolló un proceso de fabricación industrial automatizable y escalable para lipoplejos de ARN que permite un control eficiente de la proporción de mezcla. En un proceso de fabricación de escamas pequeñas (≤ 10 litros), el control de la mezcla de volúmenes idénticos de dos soluciones acuosas que contienen liposomas y ARN se logra mediante el uso de una sola bomba perfusor que acciona simultáneamente dos jeringas de gran volumen llenas de ARN o liposomas. Para el bombeo equivalente de volúmenes mayores (≥ 10 litros), se utilizan sistemas de bombeo como recipientes presurizados, bombas de membrana, bombas de engranajes, bombas de levitación magnética o bombas peristálticas en combinación con sensores de caudal con circuito de retroalimentación para control en línea y ajuste del caudal en tiempo real.

Para la fabricación automatizada de ARN lipoplejo se requiere un elemento de mezcla estático que garantice una mezcla eficiente de las soluciones acuosas que contienen ARN y liposomas. Se encontró que los elementos de mezcla de microfluidos disponibles comercialmente que contienen serpentinas y estructuras incrustadas para mejorar la mezcla, así como elementos de mezcla prototipo con arquitectura comparable, se bloquean durante la fabricación. Por tanto, estos elementos de mezcla no son adecuados para la fabricación automatizada de lipoplejos de ARN. Se encontró que los elementos de mezcla de tipo Y y tipo T con diámetros entre 1.2 y 50.0 mm eran adecuados para la fabricación automatizada de lipoplejos de ARN.

Método: Los lipoplejos de ARN se prepararon utilizando diferentes elementos de mezcla (tabla 1). Durante la fabricación de los lipoplejos, el operador observó los elementos de mezcla y se documentó la deposición de material u obstrucción.

Resultados: Con el chip de microfluidos disponible comercialmente (NanoAssemblr™, Precision Nanosystems, Vancouver, Canadá), se observó obstrucción después de la preparación de 3 mL de lipoplejos de ARN. Se hicieron observaciones similares durante la prueba de otros prototipos de elementos de mezcla de microfluidos (Tabla 5). Mientras que para todos los elementos de mezcla (micro) fluidicos que comprenden arquitecturas comparables a la deposición del elemento de mezcla disponible comercialmente y, en particular, el bloqueo de

los elementos, no hubo observaciones cuando se usaron elementos de mezcla de tipo Y o tipo T. Además del elemento mezclador de tipo y descrito con un diámetro de 2.4 mm, se han probado elementos mezcladores con diámetros mayores. Como no se encontró ninguna limitación para el diámetro del elemento de mezcla de tipo Y, se considera que el método

5 descrito es adecuado para la preparación de lipoplejos de ARN en diámetros de hasta 50 mm de los elementos de mezcla de tipo y.

Elemento de mezcla	Canal con (μm)	Lipoplejos de ARN de tamaño de partícula (nm)	Depósitos u obstrucciones
NanoAssemblr TM	ca. 0.2 mm	374	Obstrucción después de 3 mL
Prototipo 1	ca. 0.3 mm	337	Obstrucción después de 34 mL
Prototipo 2	ca. 0.3 mm	372	Obstrucción después de 88 mL
Prototipo 3	ca. 0.4 mm	336	Deposición, sin obstrucciones hasta 120 mL
Prototipo 4	ca. 1.0 mm	326	Deposición, sin obstrucciones hasta 180 mL
Elemento mezclador tipo Y	2.4 mm	348	Sin deposición, sin obstrucciones hasta 200 mL

Tabla 5: Obstrucción del chip microfluídico.

- 10 Cuando se utilizan elementos de mezcla de tipo Y o tipo T, se requiere un caudal mínimo para lograr una mezcla suficiente. La preparación de ARN lipoplejo se puede realizar mezclando dos soluciones acuosas que contienen ARN y liposomas usando un elemento de mezcla de tipo

Y o tipo T con un diámetro interno de 1.6 a 50 mm. El número de Reynolds resultante del caudal de mezcla no debe ser inferior a aprox. 300 para asegurar una mezcla eficiente. El índice de flujo al diámetro de la relación del elemento de mezcla no debe ser inferior a aprox. 150 para asegurar una mezcla eficiente. Los números de Reynolds hasta aproximadamente 2100 se

probaron experimentalmente y se encontró que eran adecuados para la fabricación automatizada. Los datos apoyan que también son factibles caudales más altos. Esto se deriva del hecho de que en el número de Reynolds de 2100 las condiciones ya estaban en modo turbulento y, por lo tanto, a velocidades de flujo aún más altas se pueden esperar condiciones de mezcla similares.

Método: Los lipoplejos de ARN se prepararon bombeando la solución de ARN y la solución de liposomas usando una sola bomba de perfusión. La formación de lipoplejo de ARN se realizó con elementos de mezcla de tipo Y representativos que comprendían un diámetro interno de 2.4 y 3.2 mm. Los tamaños de partículas y la polidispersidad de los lipoplejos de ARN se analizaron mediante mediciones de espectroscopía de correlación de fotones (PCS por sus siglas en inglés). Los números de Reynolds resultantes de la combinación investigada de caudal y diámetro de los elementos de mezcla se calcularon teóricamente utilizando la ecuación (Figura 13). El índice de flujo al diámetro de la relación del elemento de mezcla se calculó dividiendo el índice de flujo (cm^3/min) por el diámetro del elemento de mezcla (cm). El factor se da como un número adimensional.

Resultados: Cuando se fabrican lipoplejos de ARN con combinaciones de velocidad de flujo y elementos de mezcla que dan como resultado números de Reynolds calculados teóricamente por debajo de ca. 300, se forman lipoplejos de ARN con mayor tamaño de partícula y polidispersidad (Figura 13 y Tabla 6). Con el fin de garantizar la formación reproducible de lipoplejos de ARN con las características de partícula deseadas, el número de Reynolds teóricamente debería ser mín. ca. 300 (Figura 13 y 14 y tabla 6) y la relación de flujo al diámetro de la proporción del elemento de mezcla debe ser mín. ca. 150. El elemento de mezcla de 2.4 mm se encontró que permite una mezcla eficiente y reproducible de ARN y liposomas en una amplia gama de velocidades de flujo (60 a 240 ml/min). Como no se encontró un límite superior durante estos estudios, no se espera una limitación superior del número de Reynolds o del índice de flujo al diámetro de la relación del elemento de mezcla.

Diámetro del elemento de mezcla (mm)	Tasa de flujo (mL/min)	Número de Reynolds calculado ^a	Proporción de caudal al diámetro del elemento mezclador ^b
3.2	20	132	63
3.2	40	265	125
3.2	80	530	250
2.4	60	531	250
2.4	80	707	333
2.4	220	1945	917
2.4	240	2122	1000

Tabla 6: Números de Reynolds calculados y relación entre la tasa de seguimiento y el diámetro del elemento de mezcla.

^a Viscosidad (0.001 Pa s) y densidad (1000 kg/m³) de agua se utilizó para el cálculo del Número de Reynolds.

^b El factor se calculó dividiendo el caudal (cm³/ min) por el diámetro del elemento de mezcla (cm). El factor se da como un número adimensional.

Ejemplo 21: Influencia de las concentraciones de ARN

Se prepararon lipoplejos de ARN con el elemento mezclador tipo y con dimensiones representativas (2.4 mm). Para identificar el rango de concentración en donde se pueden preparar lipoplejos de ARN en la configuración actual, la concentración de ARN se varió sistemáticamente de 0.05 mg/ml a 0.5 mg/ml. Para investigar la estabilidad de los lipoplejos formados, la formulación final se ajustó a 0.05 mg/mL de ARN, 22% de sacarosa y 20 mM de NaCl y las formulaciones se congelaron tres veces.

La formación de ARN lipoplejo a concentraciones de ARN entre 0.1 y 0.5 mg/ml durante la formación de ARN lipoplejo da como resultado características de partículas comparables (Fig. 15). Las características de las partículas de tales partículas también se conservan después de tres congelaciones, lo que indica un proceso de fabricación muy robusto con respecto a las variaciones de la concentración de ARN (Fig. 16). Como no hay indicios de una limitación de la concentración de ARN durante la preparación del lipoplejo de ARN, la configuración descrita se considera adecuada para la preparación de ARN lipoplejo a una concentración de ARN de hasta 5 mg/ml.

El proceso descrito para la fabricación automatizada de lipoplejos de ARN permite la preparación reproducible de lipoplejos de ARN estables con diferentes relaciones de carga.

Método: Para probar la robustez de la preparación semiautomatizada de lipoplejos de ARN con respecto a la ración de carga, este parámetro se varió sistemáticamente de 1.0: 2.0 a 2.1:2.0 y de 2.0: 1.0 a 5.0:1:0, Los tamaños de partículas y la polidispersidad de los lipoplejos de ARN se analizaron mediante mediciones de espectroscopía de correlación de fotones (PCS).

Resultados: No se encontró ningún impacto de la variación de la relación de carga en el tamaño y la polidispersidad de los lipoplejos de ARN entre una relación de carga de 1.0: 2.0 y 2.1:2.0 (Figura 17). Por lo tanto, se considera que el rango entre 1.0: 2.0 y 2.1:2.0 da como resultado preparaciones de ARN lipoplejo con calidad equivalente. Además, se formaron partículas estables con tamaño y polidispersidad definidos entre una relación de carga de 3.0: 1.0 y 5.0: 1.0 (Fig. 18).

Ejemplo 22: Concentración de sal durante la formación de lipoplejo de ARN

Para la fabricación automatizada de lipoplejos de ARN que comprenden una alta actividad biológica, se requieren condiciones iónicas controladas durante la formación de lipoplejos de ARN. Para asegurar la actividad biológica, la formación de lipoplejo de ARN debe realizarse en presencia de NaCl de 45 a 300 mM. Otros compuestos iónicos como, por ejemplo, EDTA, HEPES, etc. contribuyen a la fuerza iónica y pueden reducir la concentración mínima requerida de NaCl.

Método: Los lipoplejos de ARN se prepararon automáticamente a diferentes concentraciones de NaCl durante la formación del lipoplejo de ARN. Los tamaños de partículas y la polidispersidad de los lipoplejos de ARN se analizaron mediante mediciones de espectroscopía de correlación de fotones (PCS). Además, se investigó la bioactividad de los lipoplejos midiendo la señal de luciferasa in vitro.

Resultados: Las características de las partículas se pueden controlar mediante el ajuste de la fuerza iónica. El aumento de las concentraciones de sal durante la fabricación indujo un tamaño de partícula ligeramente mayor (Fig. 19). Se encontró que la concentración de sal tiene un impacto en la bioactividad. El aumento de la concentración de sal durante la fabricación indujo

un aumento de la bioactividad (Figura 20). Por lo tanto, la concentración de NaCl durante la formación de lipoplejo de ARN no debe ser inferior a 45 mM de NaCl.

Ejemplo 23: Estabilización de lipoplejos de ARN

- 5 Los sistemas tampón como HEPES, ácido acético/acetato de sodio y fosfato de sodio para la estabilización de ARN en lipoplejos en el rango de pH de 5.5 a 6.7 se pueden utilizar para la estabilización de ARN en lipoplejos de ARN tanto en presencia como en ausencia de un crioprotector. Se encontró que el sistema de carbonato de sodio no da como resultado una eficacia de estabilización comparable.

10

Método: Para investigar el rango de pH óptimo y probar la idoneidad de diferentes agentes tamponadores que cubren diferentes rangos de pH (HEPES pH 6.8-8.2, ácido acético/acetato de sodio pH 3.7-5.6, fosfato de sodio pH 5.8-8.0 y carbonato de sodio pH 6.2 -8.6). Los lipoplejos de ARN se incuban inicialmente en condiciones de estrés (40 °C) en ausencia de
15 crioprotector. La integridad del ARN se analizó mediante electroforesis capilar durante 21 días. Para investigar el intervalo de pH óptimo en presencia de un crioprotector ejemplar, se incubaron lipoplejos de ARN en presencia de HEPES y sacarosa a 40°C y se analizó la integridad del ARN durante 21 días.

- 20 **Resultados:** Mientras que para los sistemas tampón HEPES, ácido acético/acetato de sodio y fosfato de sodio se obtuvieron resultados comparables, el sistema de carbonato no dio como resultado una estabilización comparable del ARN (Fig. 21). La integridad del ARN depende del valor de pH de la formulación. Se identificó que el rango de pH óptimo se encuentra en el rango de pH 5.5. y 7.4. En presencia del ejemplo de sacarosa crioprotector, se identificó un
25 intervalo de pH de 5.5 a 8.0 dando como resultado la mejor estabilización del ARN (Fig. 22).

- Los iones metálicos bivalentes pueden surgir del proceso de síntesis de ARN, excipientes de formulación o recipientes de vidrio y pueden afectar la estabilidad del ARN. La sal disódica de EDTA forma complejos estables solubles en agua con iones de metales pesados y
30 alcalinotérreos. La sal disódica de EDTA contribuye a la concentración de iones presentes durante la formación de lipoplejo de ARN y, por lo tanto, reduce la concentración de NaCl necesaria para la preparación de lipoplejos de ARN bioactivos. La formación de lipoplejo de ARN en presencia de EDTA (0 a 20 mM) es posible con el proceso descrito.

Método: Los lipoplejos de ARN se formaron en presencia de concentraciones crecientes de EDTA (hasta 18 mM) y tras la dilución se incubaron con un contenido reducido de EDTA (0.1 mM a 5.4 mM) a 40°C. La integridad del ARN se analizó como un parámetro fisicoquímico clave durante 21 días.

Resultados: Se encontró que la formación de lipoplejos de ARN en presencia de altas concentraciones de EDTA (hasta 18 mM) da como resultado características de partículas equivalentes a las de la preparación en presencia de concentraciones más bajas. No se encontró diferencia significativa entre los diferentes grupos que contenían entre 0.01% (*p/v*) (0.26 mM) y 0.2% (*p/v*) EDTA (5.2 mM) (Fig. 23) durante el almacenamiento. Como la sal disódica de EDTA contribuye a la concentración de iones presentes durante la formación de lipoplejo de ARN y puede funcionar como un eliminador de iones de metales bivalentes que potencialmente disminuyen la integridad del ARN, la presencia de concentraciones de EDTA de hasta 20 mM durante la formación de lipoplejo de ARN se considera ventajosa.

Ejemplo 24: Optimización del contenido de NaCl y crioprotectores

Las condiciones iónicas ajustadas deben ajustarse durante la fabricación de ARN lipoplejo, el almacenamiento a largo plazo y la aplicación al paciente (Figura 24). La concentración de NaCl puede ser de 45 a 300 mM durante la formación de lipoplejos de ARN; 10 a 50 mM durante el almacenamiento a largo plazo de lipoplejos de ARN en estado congelado; y 80 a 150 mM después de descongelar y diluir con solución salina.

Para cada concentración de $\text{NaCl} \leq 70$ mM, se encontró un contenido respectivo de crioprotector que no debería ser disminuido para asegurar la estabilización de las características de las partículas en múltiples congelaciones. Como crioprotector se pueden utilizar azúcares mono y bimoleculares como glucosa, sacarosa, manitol, trehalosa, sorbitol, trioles como glicerina y mezclas de los mismos en concentraciones entre 12.5 y 35.0% (*p/v*). La eficacia estabilizadora del sorbitol es menor en comparación con los últimos compuestos y la arginina no estabiliza eficazmente los lipoplejos de ARN durante la congelación.

	Crioprotector (% p/v)			
NaCl (mM)	5	10	15	20
0	X	X	X	X
20	X	X	X	X
40	X	X	X	X
60	X	X	X	X

Tabla 7: Combinaciones de concentración de NaCl y contenido de crioprotectores investigadas después de un solo paso de congelación.

	Crioprotector (% p/v)							
NaCl (mM)	10.0	12.5	15.0	17.5	20.0	22.5	25.0	27.5
50	X	X	X	X	X	X	X	X
70	X	X	X	X	X	X	X	X
90	X	X	X	X	X	X	X	X

5 Tabla 8: Combinaciones de concentración de NaCl y contenido de crioprotectores investigadas después de 1, 2, 3, 5 y 10 etapas de congelación.

Métodos: Se investigaron diferentes compuestos representativos de monosacáridos (glucosa y sorbitol), disacáridos (sacarosa y trehalosa), aminoácidos (arginina, prolina), trioles (glicerina) así como sistemas crioprotectores que contienen mezclas de diferentes azúcares (manitol y sacarosa) con el fin de identificar los crioprotectores adecuados (Fig. 25 y 26). Por lo tanto, los lipoplejos de ARN se congelaron en presencia de una concentración creciente de estos compuestos. Para identificar el contenido mínimo de crioprotector a una cierta concentración de NaCl, se congelaron los lipoplejos de ARN en presencia de cantidades crecientes de sacarosa o trehalosa como crioprotectores representativos (Tabla 7). Las muestras se congelaron inicialmente una sola vez para determinar el rango de concentración de crioprotector a investigar en detalle. En un tercer experimento, la eficacia de la estabilización del tamaño de partícula fue desafiada congelando los lipoplejos de ARN hasta 10 veces en presencia del crioprotector trehalosa (Tabla 8).

Resultados: Mientras que la arginina desestabiliza claramente los lipoplejos de ARN, los otros crioprotectores son generalmente aplicables para la estabilización de los lipoplejos de ARN durante la congelación (Fig. 25 y 26). Glicerina, manitol y sacarosa (1:1, w:w), prolina y sorbitol se pueden usar como crioprotectores para lipoplejos de ARN. Además de la arginina, todos los estabilizadores probados adicionalmente parecen adecuados, lo que indica que una amplia gama de aminoácidos, azúcares y mezclas de dichos compuestos son adecuados para la estabilización de los lipoplejos de ARN durante la congelación. La eficacia estabilizadora del sorbitol es menor en comparación con los últimos compuestos.

Al investigar en detalle la cantidad requerida de crioprotector en cada concentración de NaCl (Tabla 8), se encontró una correlación directa entre la concentración de NaCl y la concentración requerida del crioprotector después de un solo paso de congelación (Fig. 27 y 28). Considerando que se encontró una conservación aceptable del tamaño de partícula después de un solo paso de congelación para 0 a 60 mM de NaCl al 20% (p/v) sacarosa o trehalosa dihidrato, se encontró una estabilización insuficiente para un porcentaje más bajo de crioprotector (por ejemplo, $\leq 15\%$ para NaCl 60 mM; $\leq 10\%$ para NaCl 40 mM; $\leq 5\%$ para NaCl 20 mM). Dentro del rango investigado, no se encontraron diferencias entre la sacarosa y la trehalosa.

Al analizar el tamaño de partícula de los lipoplejos de ARN después de 1, 2, 3, 5 y 10 veces de congelación en presencia de las combinaciones de NaCl y trehalosa mostradas en la Tabla 8, se obtuvieron los siguientes resultados. Mientras que a una concentración de NaCl 50 mM $\geq 12.5\%$ de trehalosa fue suficiente para la estabilización de las características de las partículas lipoplejo de ARN incluso después de 10 veces de congelación (Fig. 29), a 70 mM de NaCl se requirió $\geq 12.5\%$ para la estabilización mínima y $\geq 22.5\%$ fueron necesario para la conservación exacta del tamaño de partícula (Fig. 30). A 90 mM de NaCl, se requirió $\geq 15.0\%$ de trehalosa para una estabilización mínima y no se pudo lograr la preservación exacta del tamaño de partícula incluso con la concentración más alta investigada del 27.5% (Fig. 31).

Ejemplo 25: Combinación de sal y crioprotectores para almacenamiento a largo plazo

Para el almacenamiento a largo plazo a la temperatura dada, se deben usar las combinaciones de NaCl y crioprotector enumeradas en la tabla 9.

Métodos:

Para investigar el contenido mínimo de crioprotector para el almacenamiento a largo plazo de -15 a -30 °C a una determinada concentración de NaCl, se congelaron los lipoplejos de ARN en presencia de combinaciones de NaCl y sacarosa o trehalosa. Las muestras se congelaron a -30 °C y luego se transfirieron a la temperatura respectiva para su almacenamiento a largo plazo (ya sea -15 o -30 °C). Después de un tiempo de almacenamiento definido, se analizaron las muestras y se analizó la conservación de la estabilidad coloidal midiendo el tamaño de partícula usando PCS. Estos experimentos se realizaron a una concentración de ARN total de 0.05 mg/ml.

Resultados: Mientras que las características de las partículas de los lipoplejos de ARN podrían conservarse durante la congelación en presencia de NaCl hasta 70 mM, en estos experimentos se pudo observar un efecto adicional que contribuyó a la desestabilización de la estabilidad coloidal. También se confirmó una estabilización aceptable de las características de las partículas después de la congelación para, por ejemplo, una combinación de NaCl 60 mM y sacarosa al 20%, con el tiempo el tamaño de las partículas de estas formulaciones aumentó significativamente (Fig.32 y 33) a una temperatura de almacenamiento de -15 °C. Este efecto se retrasó con el almacenamiento a -30 °C (Fig. 34 y 35).

La estabilidad de los lipoplejos de ARN a un contenido dado de NaCl depende de la cantidad de crioprotector. La cantidad de crioprotector necesario para estabilizar aumenta con el aumento del contenido de sal dentro de la solución de almacenamiento. Este efecto es independiente del tipo de azúcar utilizado como crioprotector. Composiciones de lipoplejos de ARN para almacenamiento a largo plazo en estado congelado en -15 o -30 °C deben contener el contenido de crioprotector enlistado en la tabla 9.

NaCl (mM)	Crioprotector (% w/v)	
	Almacenamiento a -15 °C	Almacenamiento a -30 °C
0	≥ 5	≥ 5
20	≥ 15	≥ 10
40	≥ 20	≥ 15
60	estabilización insuficiente	≥ 20

Tabla 9: Las concentraciones máximas aceptables de NaCl en combinación con el contenido de crioprotector (sacarosa o trehalosa) para almacenamiento a -15 °C y -30 °C.

5 Ejemplo 26: Almacenamiento a largo plazo con diferentes crioprotectores

Estabilización durante 9 meses en presencia del 22% (*P/v*) Los azúcares mono o bimoleculares son posibles con NaCl de 10 a 40 mM. Estas formulaciones se pueden congelar entre -15 y -40 °C y se pueden mantener a la temperatura respectiva para un almacenamiento a largo plazo.

10 En presencia de 12.6 a 16.8% (*p/v*) dextrano, son factibles NaCl de 10 a 30 mM. Estos experimentos se realizaron a una concentración de ARN total de 0.05 mg/ml.

Método: Para investigar el contenido mínimo de crioprotectores representativos como sacarosa, trehalosa, glucosa y mezclas, incluido el dextrano, necesarios para el almacenamiento a largo plazo a -20 °C, los lipoplejos de ARN se congelaron a un contenido de crioprotector fijo en combinación con concentraciones variables de NaCl. Para crioprotectores moleculares monoméricos o diméricos como glucosa, sacarosa y trehalosa una concentración del 22% (*P/v*) fue ajustado. Estas formulaciones se congelaron y almacenaron entre -15 y -40 °C y se investigó la estabilidad a largo plazo midiendo el tamaño de partícula usando PCS después de un tiempo de almacenamiento definido.

20 Para las formulaciones que contienen mezclas del polímero dextrano, se ajustaron las composiciones enumeradas en la tabla 10. Las muestras se congelaron y almacenaron a -20 °C. Después de un tiempo de almacenamiento definido, se analizaron las muestras y se analizó la conservación de la estabilidad coloidal midiendo el tamaño de partícula.

25 **Resultados:** Para todos los crioprotectores moleculares monoméricos o diméricos investigados, se encontró una concentración máxima de NaCl que no debe excederse para asegurar la estabilización a largo plazo de los lipoplejos de ARN en estado congelado. Mientras que 60 y 80 mM de NaCl dieron como resultado una rápida desestabilización de los lipoplejos, las propiedades coloidales se pudieron conservar durante un mínimo de 9 meses cuando la concentración de NaCl era ≤ 40 mM cuando se almacenaba a -20 °C (Tabla 10 y Figuras 36 a 38). No se pudo encontrar ninguna diferencia en la eficacia de estabilización para sacarosa, trehalosa y glucosa. Para una formulación que incluye NaCl 20 mM, no se encontró diferencia

en la estabilidad a largo plazo cuando las muestras se congelaron y almacenaron entre -15 y -40 °C (Fig. 39).

Dado que se investigaron formulaciones que contenían dextrano con menor contenido de crioprotectores (12.6 a 16.8% (*P/v*), la eficacia de la estabilización es comparable o mejor cuando se compara con azúcares mono o bimoleculares (Fig.40).

Formulación	Conc. NaCl (mM)	Dextrano 40 (% <i>P/v</i>)	Coestabilizador	Contenido de coestabilizador (% <i>w/v</i>)
Formulación 1	90	10.0	Dextrano 1	4.4
Formulación 2	90	10.0	Trehalosa	2.6
Formulación 3	70	10.0	Dextrano 1	6.3
Formulación 4	70	10.0	Trehalosa	3.1
Formulación 5	50	8.0	Dextrano 1	8.8
Formulación 6	50	8.0	Trehalosa	4.7
Formulación 7	40	0	Dextrano 1	12.9

Tabla 10: Composición de la formulación 1 a 7 que contiene dextranos (ver Figura 40).

Ejemplo 27: Secado por congelación

a) Congelar descongelar

Con el fin de determinar la concentración de crio/lioprotector más eficaz, se realizaron estudios de congelación-descongelación. Las formulaciones de ARN lipoplejo se congelaron-descongelaron en HEPES 5 mM, NaCl 80 mM, EDTA 2.6 mM con la adición de trehalosa al 10%, 15%, 20%, 25% y 30%. El tamaño de partícula se determinó antes y después del almacenamiento a -20 °C. Se observó agregación de partículas en formulaciones congeladas en ausencia de trehalosa y no se determinó su tamaño de partícula. Según la Figura 41, las formulaciones congeladas con crioprotector/lioprotector mostraron crioprotección dependiente de la concentración, el tamaño de partícula aumentó a concentraciones más bajas de lio/crioprotector. A 22% p/v de trehalosa, solo se observó un aumento mínimo en el tamaño de partícula con un Sf/Si (Sf= tamaño final, Si = tamaño inicial) de 1.04, que siendo menor que 1.3 todavía se considera aceptable. A concentraciones más bajas de trehalosa, las relaciones Sf/Si fueron más altas. Las relaciones Sf/Si obtenidas de los estudios de congelación-

descongelación se correlacionaron con las relaciones Sf/Si obtenidas de las mismas formulaciones después del secado por congelación y reconstitución.

b) Reconstitución y estabilidad de partículas

5 Las formulaciones de ARN lipoplejo preparadas en HEPES 5 mM, EDTA 2.6 mM, concentración de NaCl entre 0 mM y 80 mM y concentración de trehalosa del 10% o 22% se secaron por congelación. Todas las muestras secadas por congelación exhibieron un buen aspecto de torta. Las muestras se reconstituyeron en el volumen original con una solución de NaCl al 0.9%. Todas las formulaciones lipoplejo de ARN
10 secadas por congelación se disolvieron instantáneamente tras la reconstitución con una solución de NaCl al 0.9% o WFI. Se determinó el cambio de tamaño de partícula en formulaciones lipoplejo de ARN secadas por congelación preparadas en trehalosa al 22% después de la reconstitución con solución de NaCl al 0.9% o agua.

15 De acuerdo a Figura 42, el tamaño de partícula permaneció aproximadamente estable en todas las formulaciones lipoplejo de ARN secadas por congelación que contenían trehalosa después del secado por congelación y reconstitución. Sólo se observó una ligera disminución en el tamaño de los lipoplejos de ARN cuando las muestras secadas por congelación se reconstituyeron con NaCl al 0.9% en comparación con las muestras
20 secadas por congelación reconstituidas con agua. Se observó una correlación entre la relación de NaCl a trehalosa y la estabilidad de las partículas. El tamaño de las partículas lipoplejo de ARN aumentó en las formulaciones preparadas a concentraciones más bajas de trehalosa y concentraciones más altas de NaCl.

25 c) Experimentos de cultivo celular con formulaciones lipoplejo de ARN secadas por congelación

Se llevaron a cabo experimentos de transfección in vitro de formulaciones lipoplejo de ARN codificante de luciferasa secadas por congelación preparadas en trehalosa al 22% a diferentes concentraciones de NaCl. Las muestras secadas por congelación se
30 reconstituyeron con una solución de NaCl al 0.9%.

Acorde a la Figura 43, las formulaciones de lipoplejo de ARN secadas por congelación preparadas al 22% de trehalosa y a diferentes concentraciones de NaCl mostraron

niveles de transfección de ARN-luc similares en células dendríticas. No se encontró correlación entre la concentración de NaCl presente en la formulación de ARN lipoplejo y la transfección de ARN in vitro. Las muestras secadas por congelación mostraron una transfección de ARN-luc similar o incluso mejor en comparación con un control lipoplejo de ARN reciente.

d) Estudios de estabilidad

Se investigaron formulaciones lipoplejo de ARN secadas por congelación que contenían trehalosa al 10%, trehalosa al 22% y NaCl 0 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM y 80 mM para estudios de estabilidad a 4 °C, 25 °C y 40 °C (1 mes y 6 meses). Después de la reconstitución en el volumen original con una solución de NaCl al 0.9%, las muestras se caracterizaron por el tamaño de partícula y la integridad del ARN (% de ARN de longitud completa).

Según las Figuras 44 y 45, los tamaños de los diferentes lipoplejos de ARN no cambiaron significativamente con el tiempo independientemente de la formulación o la temperatura de almacenamiento. Curiosamente, cantidades menores de crioprotector (por ejemplo, 10%) son suficientes para mantener la estabilidad de las partículas en la formulación secadas por congelación, mientras que se requiere una cantidad mayor (por ejemplo, 22%) en el caso de la formulación congelada. La integridad del ARN (% de ARN de longitud completa) en las muestras secadas por congelación después de 6 meses de almacenamiento a 4 °C varió entre 94% y 100% y para las formulaciones de ARN (lip) almacenadas a 25 °C varió entre 85% y 94%. Sin embargo, no se identificó ninguna correlación con la relación de concentración de trehalosa a NaCl o el tiempo de almacenamiento.

Ejemplo 28: Preparación y análisis de partículas de ARN lipoplejo.

Preparación de lipoplejos de ARN

Para la fabricación automatizada por lotes de lipoplejos de ARN, todos los pasos se realizan utilizando una ruta de fluido de un solo uso preesterilizado que permite una manipulación aséptica segura de los materiales. Primero, la concentración del ARN se ajusta a la concentración de liposomas y se agrega NaCl para la condensación del ARN. De ese modo, la

solución de ARN se ajusta a una concentración de ARN que permite mezclar volúmenes idénticos de ARN y liposomas. Tanto el ARN como la solución de liposomas se transfieren a jeringas de gran volumen y ambas jeringas se montan en una sola bomba de jeringa que acciona simultáneamente los dos pistones de las jeringas. Después de la formación de lipoplejo de ARN, la concentración final del fármaco se ajusta mediante la adición de una solución crioprotectora. Después de llenar el medicamento en botellas de vidrio, el medicamento se congela como un concentrado para su almacenamiento a largo plazo.

Un atributo de calidad crítico de los lipoplejos de ARN es la relación de carga ajustada por la relación de mezcla entre el ARN y los liposomas. Se desarrolló un proceso de fabricación industrial automatizable y escalable para lipoplejos de ARN que permite un control eficiente de la proporción de mezcla. En un proceso de fabricación de escamas pequeñas (≤ 10 litros), el control de la mezcla de volúmenes idénticos de dos soluciones acuosas que contienen liposomas y ARN se logra mediante el uso de una sola bomba perfusora que acciona simultáneamente dos jeringas de gran volumen llenas de ARN o liposomas. Para el bombeo equivalente de volúmenes mayores (≥ 10 litros), se utilizan sistemas de bombeo como recipientes presurizados, bombas de membrana, bombas de engranajes, bombas de levitación magnética o bombas peristálticas en combinación con sensores de caudal con circuito de retroalimentación para control en línea y ajuste del caudal en tiempo real.

Para la fabricación automatizada de ARN lipoplejo se requiere un elemento de mezcla que garantice una mezcla eficiente de las soluciones acuosas que contienen ARN y liposomas. Se encontró que los elementos de mezcla de microfluidos disponibles comercialmente que contienen serpentinas y estructuras incrustadas para mejorar la mezcla, así como elementos de mezcla prototipo con arquitectura comparable, se bloquean durante la fabricación. Por tanto, estos elementos de mezcla no son adecuados para la fabricación automatizada de lipoplejos de ARN. Se encontró que los elementos de mezcla de tipo Y y tipo T con diámetros entre 1.2 y 50.0 mm eran adecuados para la fabricación automatizada de lipoplejos de ARN.

1. Ejemplos de composición

1.1 Composición del medicamento

La formulación 1 comprende:

- Aproximadamente (no más del) 10% de trehalosa/sacarosa
- ≤ 10 mM de NaCl

- ≤ 7.5 mM HEPES (o histidina como segunda opción)
- pH 6.5 o pH 6.7
- $\leq$ EDTA 3.5 mM.

La Formulación 1 permite la congelación de lipoplejos de ARN en condiciones de tampón, lo que permite la aplicación parenteral directa a los pacientes sin más diluciones u otros pasos. Un menor contenido de sal no conduce a una menor actividad. La osmolalidad de la formulación es adecuada para inyección intravenosa directa.

El producto farmacológico se obtiene mezclando volúmenes idénticos de solución de ARN y solución de liposomas en una configuración de ruta de fluido, donde se han optimizado las concentraciones y las condiciones del tampón. Las concentraciones del lípido catiónico en los liposomas y el ARN están en una relación molar exactamente definida (relación de carga) de 1.3 a 2. Las soluciones de los liposomas y el ARN se proporcionan en las siguientes condiciones

1.2 Composición del ARN

- Aproximadamente 0.3 mg/ml de concentración de ARN (pero en la proporción molar exacta con respecto al lípido catiónico en los liposomas)
- Aproximadamente 18 mM de HEPES
- Aproximadamente 18 mM de EDTA * 2Na * 2H₂O
- pH 6.2 a 7.0

Para compensar el cambio de pH causado por el ácido acético presente en los liposomas, el pH del tampón de la sustancia farmacológica de ARN se ajusta a pH 7.0.

La concentración del ARN se ajusta a la del DOTMA en el liposoma mediante dilución con solución salina (normal).

1.3 Composición de los liposomas

- aproximadamente 0.5 a 0.7 mM DOTMA
- aproximadamente 0.2-0.4 mM DOPE
- $\leq$ ácido acético 5 mM (preferentemente 2 mM)

La adición de ácido acético mejora la vida útil de los liposomas.

2. Ejemplos de otros agentes tamponadores adecuados y rango de pH óptimo

Los sistemas tampón como HEPES, Histidina y ácido acético/acetato de sodio para la estabilización de ARN en lipoplejos en el rango de pH de 5.5 a 7.0 pueden usarse para estabilizar ARN en lipoplejos de ARN tanto en presencia como en ausencia de un crioprotector.

Método: Para investigar el rango de pH óptimo y probar la idoneidad de diferentes agentes tamponantes, se utilizan agentes tamponantes que cubren diferentes rangos de pH (HEPES pH 6.0-7.2, Histidina pH 5.8-7.0, Acetato pH 5.5-5.8, MES pH 6.0-7.0) probado. Los lipoplejos de ARN se incuban en condiciones aceleradas (25 °C) en presencia de un crioprotector ejemplar.

- 5 La integridad del ARN se analizó mediante electroforesis capilar durante 60 días. Además, los lipoplejos de ARN se incuban en las condiciones de almacenamiento previstas (-15 °C) en presencia de un crioprotector ejemplar durante un máximo de dos años. La integridad del ARN se analizó mediante electroforesis capilar.

- 10 **Resultados:** Para los sistemas tampón HEPES, Histidina, Acetato y MES se obtuvieron resultados comparables para la preservación del tamaño de partícula y la polidispersidad de los lipoplejos de ARN en combinación con la cantidad reducida de Sacarosa y NaCl tanto en el líquido (Fig. Fig. 54, 55) y el estado de congelación (Fig. 50, 51 y Fig. 58-60). La integridad del ARN depende del valor de pH de la formulación. Se identificó que el rango de pH óptimo se encuentra en el rango de pH 6.5. y 7.0. (Fig. 48, 49, Fig. 53, Fig. 57 y Fig. 62). Se encontró
- 15 que todos los tipos de tampones probados preservaban eficientemente el pH ajustado (Fig. 52, Fig. 56 y Fig. 61).

Ejemplo 2.1: HEPES, Histidina y Acetato son adecuados para la estabilización de lipoplejos de ARN.

- 20 En el siguiente estudio, se investigaron tres sistemas tampón (HEPES, Histidina y Acetato) por su capacidad para estabilizar los lipoplejos de ARN que se formaron con liposomas que contenían 5 mM de ácido acético. Los respectivos lipoplejos de ARN se investigaron en condiciones aceleradas (25 °C) y en estado congelado (-15 °C). Se probó el rango de pH de 5.5
- 25 a 7.0, en donde los respectivos sistemas tampón cubrieron diferentes rangos de pH (HEPES pH 6.2-7.0, Histidina pH 5.8-7.0 y Acetato pH 5.5-5.8).

* solo estudio acelerado

Grupo	pH	Sistema de tampón	Conc. de tampón [mM]	NaCl [mM]	Sacarosa [% (p/v)]	EDTA [mM]	ARN @DP [mg/mL]
BM1	6.2	HEPES	7.5	20	22	2.5	0.05
1	6.2	HEPES	7.5	6.45	10	2.5	0.02

2	6.4	HEPES	7.5	6.45	10	2.5	0.02
3	6.7	HEPES	7.5	6.45	10	2.5	0.02
4	7.0	HEPES	7.5	6.45	10	2.5	0.02
5	5.8	Histidina	20	6.45	10	2.5	0.02
6	6.2	Histidina	20	6.45	10	2.5	0.02
7	6.4	Histidina	20	6.45	10	2.5	0.02
8*	6.7	Histidina	20	6.45	10	2.5	0.02
9*	7.0	Histidina	20	6.45	10	2.5	0.02
10	5.5	Na-Acetato	20	6.45	10	2.5	0.02
11	5.8	Na-Acetato	20	6.45	10	2.5	0.02

Almacenamiento líquido a 25 °C (acelerado)

Las Figuras 46 y 47 demuestran que en presencia de todos los sistemas tampón, el tamaño de partícula y la polidispersidad se mantienen bien para todos los sistemas tras el almacenamiento en condiciones aceleradas.

La Figura 48 demuestra que en presencia de todos los sistemas tampón, el pH ajustado se mantiene bien con todos los sistemas tras el almacenamiento en condiciones aceleradas.

La Figura 49 muestra que en condiciones aceleradas (25 °) se encontró la mejor estabilidad para las muestras que contenían tampón HEPES, mientras que los tampones de histidina y acetato revelaron una menor estabilidad del ARN en los lipoplejos de ARN.

Para el sistema tampón HEPES, los valores de pH superiores a 6.2 muestran una estabilidad notablemente mejorada con respecto al valor inferior. Para una mejor estabilidad, se identificó un pH de entre 6.5 y 7.0.

Para la histidina, se observa una dependencia del pH similar. Sin embargo, la estabilidad general es menor en comparación con las formulaciones tamponadas con HEPES. El acetato en general muestra una menor integridad que los otros dos sistemas, donde 5.8 muestra una mejor estabilidad que el pH 5.5.

Almacenamiento congelado (-15 °C)

Las figuras 50 y 51 muestran la estabilidad coloidal de muestras tamponadas en los mismos sistemas que se investigaron anteriormente en estado líquido a 25 °C. La Fig.50 y la Fig.51 demuestran que HEPES, Histidina y Acetato son igualmente adecuados para la conservación del tamaño de partícula y la polidispersidad de los lipoplejos de ARN en estado congelado (-15 °C). Además, puede verse que en presencia de concentraciones más bajas de NaCl, las concentraciones más bajas de sacarosa son suficientes para la conservación eficiente de la polidispersidad de los lipoplejos de ARN en estado congelado.

La Fig. 52 muestra los valores de pH de muestras tamponadas en los mismos sistemas que se investigaron antes en estado líquido a 25 °C. Eso demuestra que todos los sistemas tampón (HEPES, Histidina y Acetato) son capaces de mantener el pH en el rango ajustado en el estado congelado (- 15 °C).

La Fig. 53 muestra la estabilidad de muestras tamponadas en los mismos sistemas que se investigaron antes en estado líquido a 25 °C. En general, no hay una tendencia clara con respecto a la preservación de la integridad del ARN en estado congelado (-15 °C). Ciertas variaciones pueden deberse a errores derivados de las condiciones experimentales. La integridad algo menor para el sistema tamponado HEPES a pH 7.0 puede deberse a un artefacto experimental, ya que también para este sistema no se observa degradación con el tiempo.

Ejemplo 2.2: MES también es adecuado para la estabilización de lipoplejos de ARN

En el siguiente estudio, los dos sistemas tampón más adecuados (HEPES e Histidina) identificados en estudios anteriores se comparan con un sistema tampón adicional (MES). Se formaron lipoplejos de ARN con liposomas que contenían 2 mM de ácido acético. Los respectivos lipoplejos de ARN se investigaron en condiciones aceleradas (+25 °C) y en estado congelado (-15 °C). Aquí la atención se centró en el rango de pH entre 6.0 y 7.0, que se encontró que era el rango óptimo en estudios anteriores.

Grupo	pH	Sistema de tampón	Conc. de tampón [mM]	NaCl [mM]	Sacarosa [% (p/v)]	EDTA [mM]	ARN @DP [mg/mL]	ARN	Ácido acético en liposomas [mM]
1	6.0	HEPES	5	6.5	10	2.5	0.02	Decátopo	2
2	6.5	HEPES	5	6.5	10	2.5	0.02	Decátopo	2
3	7.0	HEPES	5	6.5	10	2.5	0.02	Decátopo	2
4	6.0	Histidina	5	6.5	10	2.5	0.02	Decátopo	2
5	6.5	Histidina	5	6.5	10	2.5	0.02	Decátopo	2
6	7.0	Histidina	5	6.5	10	2.5	0.02	Decátopo	2
7	6.0	MES	5	6.5	10	2.5	0.02	Decátopo	2
8	6.5	MES	5	6.5	10	2.5	0.02	Decátopo	2
9	7.0	MES	5	6.5	10	2.5	0.02	Decátopo	2

Estudio en tiempo real a -15 °C: fresco, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 24, 36 meses

Estudio acelerado a +25 °C: 9 semanas con 1-2 muestreos por semana

Almacenamiento líquidos a 25 °C (acelerado)

- 5 Como se puede ver en la Fig. 55, también en este nuevo estudio, no se observaron diferencias entre los sistemas tampón para la polidispersidad y el tamaño de partícula durante el almacenamiento en condiciones aceleradas. MES muestra un comportamiento comparable a Histidina y HEPES.

- 10 Como se puede ver en la Fig. 56, todos los sistemas tampón pueden mantener el pH en el rango ajustado tras el almacenamiento en condiciones aceleradas. Por lo tanto, tanto MES como HEPES e Histidina son adecuados para la fijación del pH respectivo de la formulación de ARN lipoplejo.

- 15 La Fig. 57 muestra los datos de estabilidad de los diferentes sistemas tampón tras el almacenamiento en condiciones aceleradas (25 °C). HEPES y MES muestran una estabilización comparable de la integridad del ARN, mientras que la histidina muestra una estabilidad ligeramente reducida. El pH óptimo con tampones HEPES, MES o Histidina se encontró a un pH de aproximadamente 6.5 a 7.0.

Almacenamiento congelado (-15 °C)

La Fig.58 demuestra que en presencia de todos los sistemas tampón, el tamaño de partícula y la polidispersidad se mantienen bien al congelar las formulaciones y que en presencia de concentraciones más bajas de NaCl, concentraciones más bajas de sacarosa son suficientes para una estabilización eficiente del tamaño de partícula de lipoplejos de ARN al congelarse.

Las figuras 59 y 60 demuestran que en presencia de todos los sistemas tampón, el tamaño de partícula y la polidispersidad se mantienen bien tras el almacenamiento en estado congelado. Además, puede verse que en presencia de concentraciones más bajas de NaCl, las concentraciones más bajas de sacarosa son suficientes para estabilizar eficazmente las propiedades coloidales de los lipoplejos de ARN en estado congelado.

La Fig. 61 demuestra que todos los sistemas tampón investigados (HEPES, Histidina, MES) son capaces de mantener el pH en el intervalo ajustado en el estado congelado.

La figura 62 muestra datos de estabilidad de los diferentes sistemas de almacenamiento intermedio en el estado congelado. Todos los sistemas tampón investigados (HEPES, MES o Histidina) muestran una estabilización comparable de la integridad del ARN y no hay una tendencia clara que apunte hacia un pH óptimo en el rango de pH investigado previamente optimizado.

3. Ejemplos de concentraciones de tampón más adecuadas

Para la estabilización a largo plazo de los lipoplejos de ARN tanto en estado líquido como congelado, se optimizó la concentración de tampón requerida tanto para la estabilización del pH ajustado como para la preservación de la integridad del ARN. Para asegurar la estabilización del pH y la integridad del ARN, se formularon lipoplejos de ARN con 10% (*P/v*) Sacarosa y NaCl 6.5 mM. Las muestras se almacenaron en condiciones aceleradas en presencia del sistema tampón ejemplar HEPES con las siguientes concentraciones:

- HEPES 2.5 mM
- HEPES 5.0 mM
- HEPES de 7.5 mM
- HEPES 10.0 mM

La eficacia de la estabilización se investigó con los siguientes valores de pH ejemplares:

- pH 6.2
- pH 6.7
- pH 7.2

Método: Todos los lipoplejos de ARN se prepararon automáticamente en un solo lote y las diferentes concentraciones de HEPES se ajustaron mediante la adición de una solución crioprotectora que contenía diferentes cantidades de HEPES. Los tamaños de partículas y la polidispersidad de los lipoplejos de ARN se analizaron mediante mediciones de espectroscopía de correlación de fotones (PCS). Además, se analizó la integridad del ARN mediante electroforesis capilar y se midió el pH.

Resultados: Se encontró que todas las concentraciones de tampón probadas preservaban eficientemente el tamaño de las partículas de lipoplejo de ARN y la polidispersidad en el estado líquido (Fig. 63, 64). Además, el valor de pH se mantuvo de manera eficiente (Fig. 65) y el mantenimiento de la integridad del ARN en función del pH fue independiente de la concentración del tampón respectivo (Fig. 66). En conclusión, el búfer cSe encontró que concentraciones de 2.5 mM a 10.0 mM estabilizan igualmente eficazmente la integridad del ARN en las formulaciones de lipoplejo. Se encontró que el pH óptimo estaba en el rango de pH 6.7 a 7.2.

En el siguiente estudio, se investigó la concentración de HEPES que se requiere para la estabilización del pH de los lipoplejos de ARN. Se formaron lipoplejos de ARN con liposomas que contenían ácido acético 5 mM y se ajustaron diferentes concentraciones de HEPES utilizando diferentes soluciones crioprotectoras y se investigaron los respectivos lipoplejos de ARN en condiciones aceleradas (25 °C). Se probó el rango de pH de 6.2 a 7.2.

Grupo	pH	Sistema de tampón	Conc. de tampón [mM]	NaCl [mM]	Sacarosa [% (p/v)]	Sal disódica EDTA [mM]	ARN @DP [mg/mL]
BM1	6.2	HEPES	7.5	20	22	2.5	0.05
1	6.2	HEPES	2.5	6.5	10	2.5	0.02
2	6.7	HEPES	2.5	6.5	10	2.5	0.02
3	7.2	HEPES	2.5	6.5	10	2.5	0.02
4	6.2	HEPES	5	6.5	10	2.5	0.02
5	6.7	HEPES	5	6.5	10	2.5	0.02

6	7.2	HEPES	5	6.5	10	2.5	0.02
7	6.2	HEPES	7.5	6.5	10	2.5	0.02
8	6.7	HEPES	7.5	6.5	10	2.5	0.02
9	7.2	HEPES	7.5	6.5	10	2.5	0.02
10	6.2	HEPES	10	6.5	10	2.5	0.02
11	6.7	HEPES	10	6.5	10	2.5	0.02
12	7.2	HEPES	10	6.5	10	2.5	0.02

Estudio acelerado a +25 °C: 8 semanas con 1-2 muestreos por semana

Almacenamiento líquido a 25 °C (acelerado)

5 En la Fig. 63 y la Fig. 64 se puede ver que el tamaño de partícula de lipoplejo de ARN y la polidispersidad se conservan con todas las concentraciones de tampón investigadas a los valores de pH respectivos tras el almacenamiento en condiciones aceleradas (25°C).

En la Fig. 65 se muestran los valores de pH medidos de los lipoplejos de ARN. Las muestras se almacenaron en presencia de 2.5 mM a 10.0 mM de HEPES. Se encontró que

10 concentraciones de HEPES tan bajas como 2.5 mM eran suficientes para la estabilización de los volúmenes de pH ajustados.

La figura 66 muestra los datos de estabilidad de las diferentes concentraciones de tampón. En condiciones aceleradas, se encontró que todas las concentraciones de tampón investigadas estabilizan la integridad del ARN por igual. La mejor estabilización de la integridad del ARN

15 se encontró a un pH de aproximadamente 6.7 a 7.2. Los lipoplejos de ARN almacenados a pH 6.2 mostraron una integridad del ARN ligeramente reducida.

4. Ejemplos de concentraciones más adecuadas de NaCl y crioprotector

A continuación, se dan ejemplos en los que las condiciones iónicas ajustadas durante el

20 almacenamiento a largo plazo de ARN lipoplejo y la aplicación al paciente pueden ser idénticas. No es necesaria ninguna dilución u otra modificación del producto después de la descongelación para obtener el producto inyectable. Además del rango de concentración de NaCl ya investigado durante el almacenamiento, también las concentraciones más bajas de NaCl (5 a 10 mM) son adecuadas para el almacenamiento a largo plazo. Dichos lipoplejos de

ARN se pueden administrar directamente después de descongelar y no requieren más pasos de dilución.

Para concentraciones de $\text{NaCl} \leq 10 \text{ mM}$, un contenido respectivo de crioprotector de 6.0-16.0% (P/v) se encontró que no debe ser rechazado para asegurar la estabilización de las características de las partículas en múltiples congelaciones.

Métodos: Como crioprotector representativo, se investigó la sacarosa a una concentración del 10% (P/v). En la sección 2 se ofrece una descripción detallada de los experimentos.

Resultados: Al analizar el tamaño de partícula de los lipoplejos de ARN tras el almacenamiento en estado congelado, una concentración ejemplar del 10% (P/v) se encontró que la sacarosa en combinación con una concentración de NaCl de $\leq 10.0 \text{ mM}$ era suficiente para la estabilización eficaz a largo plazo de los lipoplejos de ARN. La estabilidad coloidal en estado congelado (Fig.50, 51, Fig.58-60 y Fig.71), así como la tasa de degradación del ARN en los lipoplejos de ARN estabilizados con la formulación informada, se confirmaron por aceleración (Fig.49, Fig. 57, Fig.66 y Fig.70) y prueba de estabilidad congelada (Fig.53 y Fig.62). El contenido reducido de azúcar y el uso de histidina como agente tampón en combinación con un contenido reducido de NaCl revela resultados comparables a la formulación actual (22% de sacarosa y 20 mM de NaCl).

Ejemplo 4.1: Estabilización de lipoplejos de ARN con concentración reducida de sacarosa y NaCl

En el siguiente estudio, se investigó la estabilidad a largo plazo de los lipoplejos de ARN en estado congelado con la combinación de la concentración reducida de NaCl y sacarosa en presencia de HEPES o Histidina como agente tampón a un pH de 6.5.

Grupo	Formato de ARN	ARN (mg/ml)	NaCl (mM)	Especie de tampón	Conc. de tampón (mM)	Sacarosa (% p/v)	EDTA (mM)	pH
BM1	Decátopo	0.05	20.0	HEPES	7.4	22	2.5	6.2
1	Decátopo	0.02	7.1	HEPES	5.0	10	2.5	6.5
3	Decátopo	0.02	7.1	Histidina	5.0	10	2.5	6.5

Estudio en tiempo real a -15°C : fresco, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 24, 36 meses
 Estudio acelerado a $+25^\circ\text{C}$: 9 semanas con 1-2 muestreos por semana

Almacenamiento de líquidos a 25 °C (acelerado)

Las figuras 67 y 68 demuestran que en los sistemas que contienen un contenido reducido de NaCl y sacarosa, el tamaño de partícula y la polidispersidad se mantienen bien tras el almacenamiento en condiciones aceleradas. El tamaño de partícula y la polidispersidad son comparables a la formulación actual que contiene 22% de sacarosa y NaCl 20 mM.

La figura 69 demuestra que los sistemas resumidos son capaces de mantener el pH en el intervalo ajustado tras el almacenamiento en condiciones aceleradas. Como explicación del ligero aumento medido del pH, se identificó una función defectuosa del pH-metro usado.

La Fig. 70 muestra datos de estabilidad de las formulaciones que contienen concentraciones reducidas de sacarosa y NaCl. Cuando se compara con la formulación actual que contiene NaCl 20 mM y sacarosa al 22%, las nuevas formulaciones muestran una integridad mejorada del ARN. De acuerdo con estudios anteriores, esta estabilización mejorada se puede atribuir al valor de pH mejorado de 6.5. De acuerdo con estudios anteriores, la integridad del ARN se conserva mejor con HEPES en comparación con la histidina.

Almacenamiento congelado (-15 °C)

La figura 71 demuestra que los sistemas descritos pueden estabilizar propiedades coloidales como tamaño de partícula de las formulaciones. Toda la formulación se puede congelar con cambios mínimos en el tamaño de las partículas.